



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS DIADEMA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA



GIOVANA DE MIRANDA GUIMARÃES SILVA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MASSAS MOLARES DE
POLIETILENOGLICOL NA EXTRAÇÃO DE
ANTOCIANINAS DE JUÇARA UTILIZANDO SISTEMA
AQUOSO BIFÁSICO**

Diadema/SP

2019

Giovana de Miranda Guimarães Silva

**Influência de diferentes massas molares de polietilenoglicol na
extração de antocianinas de juçara utilizando sistema aquoso
bifásico**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como exigência parcial para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Química, ao Instituto de
Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas
da Universidade Federal de São Paulo – Campus
Diadema, sob orientação da Prof^a. Dra. Anna
Rafaela Cavalcante Braga.

DIADEMA/SP

2019

Silva, Giovana de Miranda Guimarães;

Influência de diferentes massas molares de polietilenoglicol na extração de antocianinas de juçara utilizando sistema aquoso bifásico/ Giovana de Miranda Guimarães Silva. - -

Diadema, 2019.

54 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2019.

Orientador: Prof.^a. Dra. Anna Rafaela Cavalcante Braga

1. Pigmentos Naturais 2. Antocianinas 3. Sistema Aquoso Bifásico 4. Extração

I. Braga, Anna Rafaela Cavalcante Braga. II. Influência de diferentes massas molares de polietilenoglicol na extração de antocianinas de juçara utilizando sistema aquoso bifásico

CDD 664.062

RESUMO

As cores estão conectadas com todos os âmbitos da vida humana podendo influenciar as tomadas de decisão diária, inclusive dos alimentos que são consumidos. Relatos apontam que corantes naturais eram comumente utilizados no Egito para colorir comida desde 1500 a.C. Porém durante a Revolução Industrial houve grande aumento na produção e consumo de corantes sintéticos devido a vantajosa relação entre custo e velocidade de produção. Recentemente hábitos mais saudáveis e a preocupação com o meio ambiente levou o mercado a aumentar a utilização de pigmentos naturais para colorir alimentos. Em 2015 a demanda global de pigmentos foi de 1500 Mega toneladas, sendo aproximadamente 42% de origem natural. As antocianinas abrangem o grupo mais diverso de pigmentos naturais e proporcionam uma gama de cores atrativas para alimentos, além de agir como antioxidante e anti-inflamatório no corpo humano. Este corante pode ser extraído do fruto da juçara com a utilização de polietilenoglicol como solvente por meio de extração líquido-líquido. Este trabalho tem como objetivo estudar a influência de diferentes massas molares de polietilenoglicol na extração de antocianinas pelos métodos diferencial do pH, fator de purificação, fator de recuperação e concentração média através da realização de três experimentos de procedimentos idênticos, porém com a utilização de massas molares de PEG de 1500 g/mol, 6000 g/mol e 8000 g/mol em cada condição avaliada. A melhor condição obtida para extração das antocianinas da polpa da juçara foi utilizando o PEG 8000 e pH 6,0 na fase topo, com fator de purificação 1,41, recuperação em 119,09% e concentração média 581,9 mg/100g. Através dos resultados obtidos, verificou-se que o aumento da massa molar de PEG influencia a extração da antocianina. Houve uma maior concentração média de antocianina observada nos PEGs 6000 e 8000 em relação ao PEG 1500 o qual apresentou resultados inferiores, principalmente ao se comparar a concentração média de 573 mg/100 g, uma diferença de 2% em relação ao PEG 8000 e 17% para o PEG 6000. Portanto o PEG 8000 obteve as melhores respostas de fator de recuperação e coeficiente de partição e além de possuir uma média de concentração média próxima ao PEG 6000.

Palavras chave: Antocianinas. Corantes. Polietilenoglicol. Extração líquido-líquido.

ABSTRACT

The colors are related to all the scopes of human life and can influence the daily taken decision, including the foods that are consumed. Reports indicate that natural dyes were commonly used in Egypt to color food from 1500 BC but during the Industrial Revolution there was a large increase in the production and consumption of synthetic dyes due to the advantageous relation between cost and speed of production. Recently, healthier habits and concern about the environment has led the market to increase the use of natural pigments to color food. In 2015 the global demand for pigments was 1500 mega tons, in which approximately 42% are from natural origin. Anthocyanins comprise the most diverse group of natural pigments and provide a range of colors attractive to food, besides, it can act as antioxidant and anti-inflammatory in the human body. This dye can be extracted from the fruit of the juçara using polyethylene glycol as solvent in a liquid-liquid extraction process. The following thesis aims to study the influence of different molar masses of polyethylene glycol on the extraction of antocyonin by differential pH, purification factor, recovery factor and mean concentration by performing three identical procedure experiments, using PEG molar masses of 1500 g/mol, 6000 g/mol and 8000 g/mol in each experiment. It is expected that for greater PEG molar masses the extraction will be more efficient. The best condition obtained for extraction of the anthocyanin from the juçara pulp was using PEG 8000 and pH 6,0, the purification factor was 1,41, the recovery factor was 119% and the average concentration 581,9 mg/100g. Through the results obtained, it was verified that the increase of the molar mass of PEG influences the extraction of antocyanins. There was a higher a concentration of anthocyanin observed in PEG 6000 e 8000 then in PEG 1500 which presented lower results, mainly when comparing the medium concentration 573 mg/100 g, obtaining a 2% difference comparing to PEG 8000 e 17% difference comparing to PEG 6000.

Key words: anthocyanins, dye, polyethylene glycol, liquid-liquid extraction, molar mass.

Índice de Figuras

Figura 1. Coloração da Antocianinas	4
Figura 2. Sir William e o pigmento Mauve	7
Figura 3. Porcentagem de uso de corantes no mundo pelas indústrias de alimentos e bebidas.....	12
Figura 4. Antocianinas mais comum em alimentos arranjadas pelo aumento da coloração vermelha e azul	15
Figura 5. Estrutura básica das antocianinas, 2- estrutura básica dos flavonoides.....	16
Figura 6. Espectro de absorção da cianidina-3-ramnosilglucosídeo em pHs diferentes	16
Figura 7. Antocianina em pó.....	17
Figura 8. Árvore de Juçara.....	18
Figura 9. Polpa Juçara.....	19
Figura 10. Representação da Fórmula Molecular do Polietilenoglicol, ressaltando as ligações químicas disponíveis.....	20
Figura 11. ELL	21
Figura 12. Diagrama de fases dos componentes A e B	23
Figura 13. Solução tampão com pH 6,0	27
Figura 14. Esquema de extração das fases topo e fundo	28
Figura 15. SAB antes do incremento da polpa; após incremento da polpa; após descanso de 24	31
Figura 16. Influência da Massa Molar na Concentração de Antocianina na fase topo.....	36
Figura 17. Influência da Massa Molar no fator de recuperação na fase topo	37

Índice de tabelas

Tabela 1. Componentes que formam SAB	4
Tabela 2. Pigmentos alimentícios permitidos pela ANVISA	9
Tabela 3. Produção de urucum para finalidades da indústria de pigmentos alimentícios	11
Tabela 4. Pontos abordados para o PEG 1500 e pH 6.....	28
Tabela 5. Pontos abordados para o PEG 6000 e pH 6.....	29
Tabela 6. Pontos abordados para o PEG 8000 e pH 6.	29
Tabela 7. Composições do SAB para o PEG 1500 e pH 6.	30
Tabela 8. Composições do SAB para o PEG 6000 e pH 6	30
Tabela 9. Composições do SAB para o PEG 8000 e pH 6.	31
Tabela 10. Pontos escolhidos para análises espectrofotométricas	32
Tabela 11. Volume do fundo	32
Tabela 12. Volume do topo	32
Tabela 13. Quantidade média de antocianina via extração SAB	33
Tabela 14. Quantidade média de antocianina via extração Convencional	33
Tabela 15. Fator de purificação e recuperação da antocianina na fase fundo	34
Tabela 16. Fator de purificação e recuperação da antocianina na fase topo	34
Tabela 17. Coeficiente de partição e razão volumétrica para fases de topo e fundo	35
Tabela 18. Média das concentrações e fator de purificação de cada massa molar de PEG ...	3

Sumário

1.INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	3
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. História e Evolução dos Corantes	5
3.2 Importância dos Corantes nos Alimentos e Riscos à saúde	7
3.3 Mercado dos pigmentos Naturais e Sintéticos	10
3.4 Classificação dos Pigmentos	12
C.I – Naturais	12
C.II- Sintéticos	12
C.III- Sintéticos Idênticos ao Natural	13
C.IV- Inorgânicos	13
C.V – Caramelo	13
3.5 Antocianinas	14
3.6 Juçara	17
3.7 Polietilenoglicol	19
3.8 Extração Líquido-Líquido	20
3.9 Quantificação do Teor de Antocianinas da Polpa da Juçara	24
3.9.1 Método do pH diferencial	24
3.9.2 Estudos de Partição	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Juçara	26
4.2 Extração de Antocianinas	26
4.2.1- Extração Padrão ou Convencional	26
4.2.2 Extração por SAB	26
4.3 Preparo do tampão	26
4.4 Preparo do SAB	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1 Extração por SAB	28
5.2 Extração por Método Convencional	33
5.3 Estudo de Partição	34
5.4 Influência da Massa Molar na Extração	35
6.CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	38

7. CRONOGRAMA	39
8. BIBLIOGRAFIA	40

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A coloração dos alimentos é vista como uma medida de qualidade e um indicativo de nutrientes. Com o intuito de melhorar o apelo comercial do alimento, muito dos processos em indústrias alimentícias servem para transformar as qualidades perceptivas aos olhos dos seres humanos (CHAITANYA, 2014). Um velho ditado diz que “Primeiro as pessoas comem com os olhos” ilustra bem a estratégia de grandes empresas de atrair os consumidores. Antes de um prato ser consumido, a textura e coloração do alimento são analisadas pelas pessoas, pontos que podem ser definitivos na compra do produto (SALFIELD, 1977).

O uso de pigmentos naturais em alimentos para conferir uma aparência mais apetitosa pode ser observado em diferentes períodos da história humana, como em 2600 a.C na China e na Era do Bronze na Europa. Inscrições mostram o uso de vinhos e flores como pigmentos naturais, porém a obtenção destes compostos necessitava de muita matéria prima, além de ter um processo lento e com baixa produção. A primeira aparição de um pigmento sintético foi apenas em 1856, descoberto por Sir William Henry Perkin ao descobrir a Mauveína. Com a evolução econômica e industrial, o interesse por produções massivas de pigmentos alimentícios cresceu e assim métodos mais eficientes de extração de pigmentos naturais e a fabricação de pigmentos sintéticos aumentou. Os chamados “*coal tar*” ou Alcatrão de Hulha, produtos derivados do petróleo, como a anilina, ganhou importância por ser um produto de fácil fabricação e com alta produção (KAHL, 2011).

A demanda de pigmentos no mercado global em 2000 atingiu 2400 Mega toneladas, em 2005 de 3000 Mega toneladas e em 2015, 15000 Mega toneladas. A participação de pigmentos naturais no mercado aumentou em 1 bilhão de dólares de 2000 até 2015 com previsões de aumento para os próximos anos devido à escolha dos consumidores por alimentos mais saudáveis e naturais, que não tenha passado por tantos processos industriais (REE, 2016).

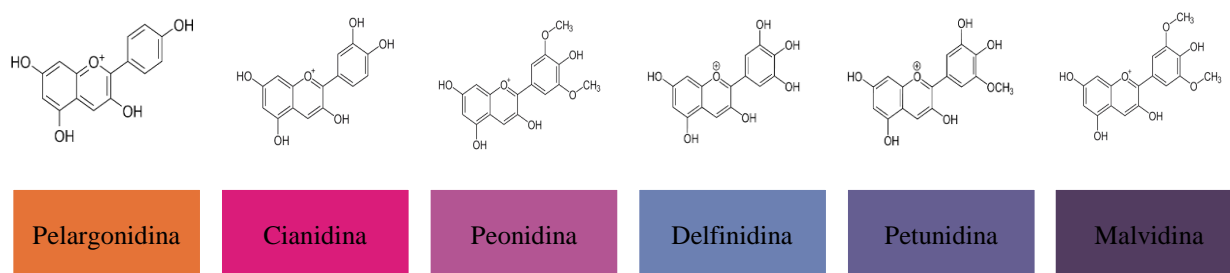
A preocupação por hábitos mais saudáveis e a crescente demanda por alimentos orgânicos incentivou pesquisadores a entender os malefícios de pigmentos sintéticos. Rowe (1994) estabeleceu uma associação com a ingestão por parte de crianças de pigmentos sintéticos com um comportamento hiperativo relatado pelos pais. Aproximadamente 800 crianças em Melbourne participaram do processo, no qual todas as crianças ingeriam alimentos sem nenhum tipo de pigmento alimentício. Os pais de 150 crianças reportaram uma melhora no comportamento (ROWE, 1994).

As antocianinas abrangem o grupo mais diverso de pigmentos naturais e proporcionam uma gama de cores atrativas para alimentos, além de agir diretamente no sistema imunológico

do corpo humano, oferecendo benefícios tais como ações antioxidante e anti-inflamatórias. Em vista desses benefícios, o uso das antocianinas aumentou em comparação aos últimos anos, sendo utilizada tanto em cosméticos quanto nos alimentos (HE; GIUSTI, 2010). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que faz a regulamentação de pigmentos alimentícios no Brasil, definiu com a resolução RDC N° 34 que pigmentos naturais com antocianinas em sua base podem ter uso de forma ilimitada nas indústrias (ANVISA, 2001).

A cor das antocianinas varia de acordo com o pH do ambiente e da presença de ligantes na cadeia principal da antocianina e onde esses ligantes estão acoplados nesta cadeia. Para pH entre 1-6 apresenta uma coloração rosa avermelhada, coloração roxa avermelhada em soluções neutras e em soluções básicas uma cor azul (FOSSEN et al., 1998). A variação das cores das antocianinas assim como suas diferentes estruturas são mostradas na Figura 1.

Figura 1– Coloração das Antocianinas



Fonte- Própria

Na extração líquido-líquido há formação de fases ocasionadas principalmente pela afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão de fases e do número de extrações (HUBBERT, 1999).

Para o uso ser vantajoso é preciso encontrar um meio de extração não tóxico, com baixo custo, transferência de massa alta e rendimento elevado. O Sistema aquoso bifásico (SAB) se tornou um método efetivo e de baixo custo para a extração de antocianinas. Formado por dois componentes que possuem afinidade com a água e que ao serem misturados em determinadas concentrações se separam em duas fases (GARZA-MADRID et al., 2010). A Tabela 1 exemplifica alguns sistemas amplamente utilizados na extração líquido-líquido.

Tabela 1– Componentes que formam SAB

Componente 1	Componente 2
--------------	--------------

Polietilenoglicol	K_3PO_4 , Na_3PO_4
Polipropilenoglicol	Polivinilalcool,
Metilcelulose	Dextrana

Fonte - Adaptado “Estudo de Sistemas Aquosos Bifásicos Formados com PEG 1500 e Sais de Sulfato de Sódio em Diferentes Temperaturas” (CBQ, 2014)

O polietilenoglicol pode ser considerado o polímero mais utilizado em estudos de SABs, por ser um polímero sintético e hidrofílico, fatores necessários para a formação do sistema bifásico. Podem ser encontrados com diferentes massas molares, encontrados como PEG com as variações em suas massas de 4000, 6000 e 8000 (FIGUEIREDO, 2009).

Com a inovação e crescimento da química verde, a possibilidade de substituir os sais inorgânicos no SAB vem aumentando, porém os fosfatos e sulfatos continuam a ser os sais mais utilizados (LOH, 2000).

Diferentes massas molares de PEG foram estudados neste trabalho a fim de avaliar qual deles apresenta uma partição mais eficiente de antocianinas, visto a grande demanda de pigmentos naturais e a produção em larga escala para as indústrias.

2. OBJETIVOS

Estudar a influência de diferentes massas molares do polietilenoglicol (PEG) na extração do corante natural antocianinas da fruta juçara pelo sistema aquoso bifásico avaliados pelos métodos de diferença de pH, fator de recuperação, fator de partição e fator de partição.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. História e Evolução dos Corantes

A cor sempre fez parte da história da civilização, e poderia ser considerada como um dos maiores marcos da evolução humana (GOLDMAM, 1964). Devido à grande persistência dos seres humanos a descoberta das colorações naturais pode resistir por milhares de anos e ser encontrada em diversas fontes, como animais e plantas. Esses pigmentos eram utilizados para diversas finalidades, em um primeiro momento para gravar a história das civilizações em papiros ou cavernas, até o tingimento de roupas e alimentos (BECHTOLD et al., 2009).

Através dos anos as cores influenciaram a vida dos homens tanto nas artes como na ciência, sendo possível obter registros arqueológicos em 40.000 a.C no Egito, como roupas e utensílios coloridos a partir de plantas espinhosas (WEITZ, 1994). A partir de 5.000 a.C esses

pigmentos eram utilizados em cosméticos, tais como o carvão e beterraba , em 1500 a.C o uso de corantes naturais era comumente usados para dar coloração aos alimentos, o uso das substâncias naturais para colorir a comida eram obtidos principalmente da planta *Curcuma longa* , mais conhecido como açafrão (BORZELLECA E HALLAGAN, 1992).

A extração desses pigmentos era obtida essencialmente de plantas, insetos, cascos, raízes, ou flores, sendo necessária a aplicação de diversas operações mecânicas e físicas como maceração, decantação, filtração, precipitação entre outros para obter a coloração final (FENNEMA, 2008).

Um grande exemplo do uso de pigmento natural na história do Brasil é o emprego do Urucum pelos indígenas brasileiros, são diversas as finalidades do *Bixa orellana L.* como, por exemplo, a proteção contra insetos, queimaduras de sol e como corantes alimentícios (LORENZI, MATOS, 2002).

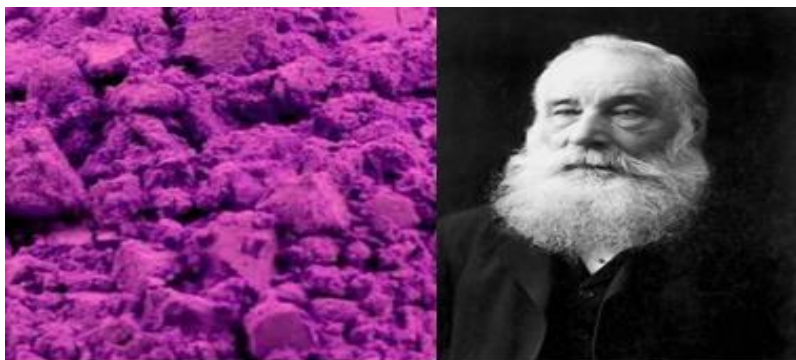
Em meados de 1850, qualquer corante alimentício provinha de apenas três diferentes fontes, de origem vegetal, animal e mineral. Vegetais, como por exemplo, a uva fornecendo a cor preta, o ácido carmínico proveniente da inseto cochonilha que produz a cor vermelha e o mineral Lápis-lazúli, recurso que oferece o pigmento azul (OS CORANTES ALIMENTÍCIOS, REVISTA ADITIVOS & INGREDIENTES, 2015).

O primeiro corante sintético foi descoberto acidentalmente apenas em 1856, pelo pesquisador Sir William Henry Perkin, representado à direita na Figura 2, anteriormente a essa data apenas corantes naturais eram produzidos. A Mauveína, à esquerda na Figura 2, produzida através da Malva, como é comumente conhecido, foi largamente utilizada na coloração de tecidos, tornando a fabricação e customização de roupas um processo muito mais ágil. (TOLEDO, 1990).

Sir William realizava experimentos para sintetizar Quinina ($C_{20}H_{24}N_2O_2$), um componente que combate à malária. Nessa época acreditava-se que com apenas balanços de massa na equação seria possível obter o material desejado. Perkin ao terminar o experimento observou que não se formou quinina, apenas um precipitado vermelho amarronzado com água. (FILAROWSKI, 2010).

Decidido a continuar seus experimentos, Henry decidiu mudar o experimento usando novos componentes, a Anilina, sulfato e dicromato de potássio, essa nova solução formou um precipitado preto que ao ser lavado com álcool formava a Mauveína, nomeado como Púrpura de Tiro e anos mais tarde como Mauve (FILAROWSKI, 2010).

Figura 2– À esquerda, pigmento Mauve, à direita Sir William.



Fonte - Downham & Collins, 2000.

Segundo Weitz (1994), houve uma grande intensificação na produção de corantes artificiais após a descoberta de Sir William, o interesse por novas cores e por uma maior durabilidade era a maior preocupação no momento. Os corantes naturais podiam obter mais durabilidade e cores mais intensas ao adicionar sais de ferro e alumínio. Assim poderiam repor a cor natural dos alimentos que ao sofrerem processos de industrialização ou serem armazenados, perdia parte de suas propriedades materiais.

No século XVIII, houve um aumento em larga escala da indústria química, e a demanda de corantes na indústria alimentar não podia ser suprida pelos corantes naturais, feitos em baixa escala, nesse momento (MOREIRA, et al. 2014).

3.2 Importância dos Corantes nos Alimentos e Riscos à saúde

O Conselho Regional de Química (CRQ) define Pigmentos e corantes como substâncias que ao serem utilizadas em algum material proporcionam cor, sendo que a diferença entre estes está na solubilidade e cobertura, no qual os pigmentos são insolúveis e os corantes solúveis e na cobertura o corante proporciona o tingimento, porém mantem a transparência do material (CRQ, 2011).

Segundo Cunha (1997), corantes e pigmentos são componentes que podem conferir ou intensificar a coloração de algum produto com a intenção de oferecer a mesma propriedade que o natural.

As cores estão conectadas com todos os âmbitos da vida humana, podem influenciar as tomadas de decisões diárias, e uma delas é a escolha do alimento, que pode ser influenciada pela aparência, atributo influenciado quase que totalmente por sua cor. A relação do alimento com sua cor está intrinsecamente ligada à evolução perceptiva, dependente de memórias e

experiências, como por exemplo, uma banana verde sugere a sensação da “boca amarrada”. Embora influencie apenas no consciente das pessoas, essa aversão gera grandes problemas para as indústrias alimentícias na formulação das comidas e bebidas (CONSTANT, STRINGHETA, SANDI, 2002).

Em grande parte dos países existe uma regulamentação que visa especificar as concentrações, fonte, pureza e em quais alimentos podem ser usados os pigmentos. Esse regulamento varia entre os países de acordo com as culturas e as próprias legislações alimentares de cada lugar. Em alguns casos essas leis existem em benefício a saúde do consumidor, como no caso do pigmento Vermelho amaranço, proibido em diversos países e banido nos Estados Unidos como suspeito de ser um agente cancerígeno, porém é amplamente utilizado no Brasil em cereais, sorvetes, geleias, entre outros (SZTAJN, 1988).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que faz o regulamento desses aditivos alimentares e estabelecem uma quantidade diária aceitável de ingestão (IDA), expressa em miligrama por quilo de peso corpóreo (mg/kg p.c.), entretanto o IDA pode sofrer constantes modificações, provenientes de pesquisas mais atualizadas a respeito da ação desses químicos no corpo e das recomendações feitas pelos comitês FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) e OMS (Organização Mundial da Saúde), estabelecendo um máximo valor de ingestão diária que seria possível usar no alimento para que seja inofensivo à saúde.

Amplos estudos são realizados a fim de determinar a toxicidade e poderes maléficos à saúde advindos dos pigmentos. Alguns desses resultados obtidos em laboratórios de pesquisa animal demonstraram cobaias com simples alergias, ou até mesmo com câncer. O FDA (Food and Drug Administration) proíbe o uso do Amaranço nos Estados Unidos pois estudos realizados previamente indicam tendências cancerígenas aos animais que o consumiram, entretanto, esse mesmo estudo não obteve os mesmos resultados no Canadá e, portanto, esse aditivo é legalizado no país (KAPADIA et al., 1988). A Tabela 2 contém algumas das substâncias permitidas pela ANVISA com seus respectivos malefícios (WARD, 1997).

Yamazaki (1994) realizou um estudo para demonstrar os efeitos nocivos dos pigmentos amarelos, o Tartrazina e Amarelo Crepúsculo. Nesse trabalho ele identificou que a síntese de tromboxano (vasodilatadores na circulação pulmonar) era inibida causando falhas na contração dos vasos sanguíneos. Em outro estudo realizado no Japão, foi administrado 50 mg de corante sintético para um grupo de 47 crianças, cada pessoa recebeu randomicamente o corante a ser ingerido. Após um período de 120 minutos do consumo do corante realizaram-se

exames de sangue e exames neurológicos para determinar se houve diferença comportamental e toxicológica. Em resposta aos exames neurológicos, 60% das crianças demonstraram comportamento agressivo e hiperatividade. Para os exames toxicológicos houve uma significativa redução nos níveis de Ferro e Zinco (WARD, 1997).

Tabela 2 – Pigmentos Alimentícios permitidos pela ANVISA

Cor	Substância	CAS	Sinônimo	Descrição (IUPAC)	Usos	Restrições
Vermelho	Carmim de cochonilha	1390-65-4	Vermelho 4	3,5,6,8-tetrahydroxy-1- methyl-9,10-dioxo-7-[3,4,5- trihydroxy-6- (hydroxymethyl)-Oxan-2- yl]anthracene-2-carboxylic acid)	Cereais, balas, laticínios.	Pode causar hiperatividade, bronquite
Vermelho	Amaranto	12227-62-2	Bordeau S INS 123	trisodium (4z)-3-oxo-4- [(4- sulfonatophthalen- 1-yl) hydrazinylidene] naphthalene-2,7- disulfonate	Geleias, xaropes, sorvetes.	Pode causar asma, hiperatividade, reações alérgicas.
Vermelho	Vermelho Eritrosina	16423-68-0	Eritrosina; Vermelho N.º 3;	disodium 2-(2,4,5,7-tetraiodo3-oxido-6-oxoxanthene-9-yl) benzoate	Refrescos em pó, pós para gelatinas.	Pode causar eczema, reações alérgicas e não pode ser utilizado próximo da região dos olhos
Vermelho	Ponceau	4548-53-2	Vermelho 4R	disodium (3e) -3- [(2,4-dimethyl5-sulfonatophenyl) hydrazinylidene]-4- oxonaphthalene- 1- sulfonate	Frutas em caldas, sobremesas, bebidas.	Não permitido na área dos olhos, em dispositivos médicos e formas farmacêuticas injetáveis
Azul	Sal de Cálcio	3536-49-0	Azul patente	ethanaminium, n-[4- [(4- (diethylamino) phenyl)](5- hydr0xy-2,4- disulf0phenyl) methylene]-2,5- cyclohexadien -1- ylidene]- n-ethyl-, inner salt, calcium salt (2:1)	Gomas de mascar, caramelo	Pode causar sensibilidade da pele, urticária, prurido, náuseas, diminuir a pressão arterial, tremores e problemas respiratórios.
Amarelo	Amarelo Tartrazina	1934-21-0	Amarelo 5 ins 102	trisodium (4e)-5-oxo-1- (4- sulfonatophenyl)-4-[(4- sulfonatophenyl) hydrazinylidene] pyrazole -3- carboxylate	Laticínios, licores.	Utilizado em cosméticos e medicamentos. O uso dessa substância deve ser relatado no rótulo.

Fonte: adaptada da ANVISA, 1977

Em 1997, Ward propôs a relação da ingestão de pigmentos com a hiperatividade. Nesse estudo 486 crianças entre 7 a 13 anos diagnosticadas com hiperatividade foram analisadas após a ingestão de comidas e bebidas com aditivos coloríficos, notou-se um aumento da hiperatividade em 60% das crianças. Em contrapartida das 172 crianças do grupo controle, em apenas 12% delas reportou-se problemas ligadas da ingestão de corantes artificiais. Este estudo sugeriu que com a ingestão desses alimentos a quantidade de Zinco e Ferro no plasma sanguíneo diminuiu e houve aumento de Zinco na urina das crianças hiperativas após a ingestão

de Tartrazina e Amarelo crepúsculo em relação ao grupo controle. O Amaranto, também utilizado na pesquisa, não mostrou modificações consistentes no tempo de pesquisa, de aproximadamente 2 horas após consumo dos alimentos. Das 38 crianças que ingeriram alimento com Tartrazina, 18 obtiveram níveis maiores de hiperatividade, 16 ficaram agressivas e 4 crianças se tornaram violentas.

A Primeira evidência das ações maléficas dos pigmentos artificiais no corpo humano surgiu em 1906 ao se observar a formação de células atípicas na pele da orelha de um coelho após ter recebido aplicação do corante Vermelho Escarlata na pele. Em camundongos observou a formação de adenomas hepáticos, após pesquisadores, em 1924 injetarem esse mesmo pigmento na alimentação dos roedores. A partir de então muitas pesquisas foram realizadas a fim de estudar as ações e as estruturas químicas destes materiais (LEDERER,1990).

3.3 Mercado dos pigmentos Naturais e Sintéticos

Mapari (2005) descreveu que, durante o século XVIII houve uma crescente demanda de alimentos dada a revolução industrial e o crescimento exponencial da população. Esse aumento requeria um aumento na produção alimentícia em larga escala fazendo com que as indústrias alimentícias se desenvolvessem rapidamente e, portanto, o uso de corantes sintéticos surgiu como um modo de contornar os naturais, visto que a facilidade de produção, o menor valor custo, a estabilidade química e de sua cor superarem os naturais. A indústria de pigmentos ganhou muita importância após comerciantes notarem as diferenças de cores que o alimento gerava após serem colhidos, transportados e armazenados, porém principalmente quando sofriam algum tipo de processo, como por exemplo, alguma diferença de temperatura ou pressão. Porém para ter empregabilidade, o pigmento deve ser viável economicamente ou seu uso seria vetado, os requisitos para o uso são:

- Síntese com composição conhecida e reproduzível
- Deve ser utilizado em forma estável no alimento
- Deve possuir alto poder colorífico

Com a preocupação mundial de uma alimentação mais saudável, a indústria alimentícia tenta contornar essa situação investindo em corantes naturais, desenvolvendo novos processos para fabricação de pigmentos naturais em grande escala substituindo os artificiais (CHO, 2002). Aditivos naturais ainda possuem a vantagem de não poluírem o ambiente pois são biodegradáveis e não serem prejudiciais à saúde. Com essa crescente preocupação do consumidor com saúde e meio ambiente as indústrias estão passando a optar por produtos

“limpos”, que utilizem principalmente plantas, flores, insetos e microrganismos como matéria-prima (MAPARI, 2005).

No Brasil, o IBGE realizou uma pesquisa em 1975 para avaliar o crescimento da produção do Urucum utilizado na indústria alimentícia. Em 12 anos houve um aumento de 92 toneladas para 1210 toneladas em 1987, como mostrado na Tabela 3 (IBGE, 1975).

Tabela 3 - Produção de Urucum para finalidades da indústria de pigmentos alimentícios

Estado	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981
Rondônia	-	-	-	-	-	-	-
Maranhão	-	-	-	-	-	-	-
Piauí	7	12	27	43	44	60	49
Ceará	-	10	12	164	168	162	160
Paraíba	30	33	34	33	211	221	436
Pernambuco	-	-	-	-	-	-	-
Sergipe	-	-	-	-	-	-	-
Bahia	-	-	-	-	-	-	-
Minas Gerais	29	27	29	31	32	34	156
Rio de Janeiro	10	8	9	9	68	59	95
Pará	16	17	19	22	16	18	22
Brasil	92	107	130	302	539	554	918

Fonte – adaptado IBGE, 1975

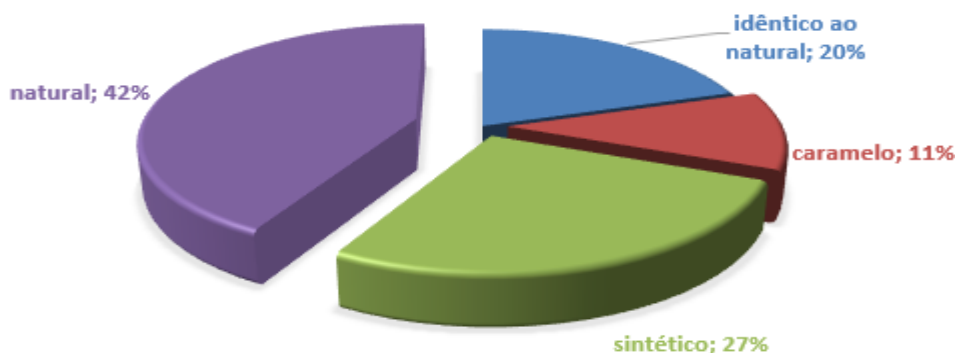
Para as produções de pigmentos naturais de uso de pequena escala no Brasil, como as antocianinas, betanina da beterraba e hemoglobina, as indústrias optam pela importação visto que não são amplamente utilizados. A betanina é adquirida no CEASA, centrais de abastecimento, sendo que a principal produtora está em Sorocaba. Para as antocianinas a fonte principal vem da casca da uva, porém dificilmente é comercializada visto que as vinícolas utilizam da casca para a produção de vinho, portanto, quando se há necessidade do uso deste composto, é feita a importação da Itália. Já para a hemoglobina, é obtido diretamente de alguns frigoríficos.

Estima-se que a produção de pigmentos e corantes seja aproximadamente 700 mil toneladas por ano, sendo que 3,78% é usado exclusivamente no Brasil. O percentual de crescimento chega a ser de 2 a 5% ao ano para sintéticos e 5 a 10% para naturais. A porcentagem dos diferentes tipos de corantes utilizados pela indústria de alimentos está explicitada na Figura 3 (STRIGHETA, 2007).

As pesquisas relacionadas a pigmentos naturais são os grandes propulsores do mercado, desenvolvendo processos de extração que forneçam a qualidade requerida pelas indústrias,

baixo custo e estabilidade. O Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos (CTAA), da EMBRAPA pesquisa desde os anos 80 fontes alternativas tais como folhas de hibisco, casca da batata doce roxa, para obtenção de antocianinas (GUIMARÃES, 1984).

Figura 3 – Porcentagem de uso de corantes no mundo pelas indústrias de alimentos e bebidas



Fonte: adaptado de Downham & Collins, 2000.

3.4 Classificação dos Pigmentos

Por meio do Compêndio da Legislação de Alimentos de 1989 e da ABIA (Associação Brasileira da Indústria de Alimentos) foi estabelecida a seguinte classificação de corantes Alimentícios com seus respectivos códigos:

Naturais (C.I.), Sintéticos (C.II.), Sintéticos Idênticos aos Naturais (C.III), Corantes Inorgânicos (C.IV), Caramelo (C.V) (ABIA,1989).

C.I – Naturais

Segundo a resolução nº44 da ANVISA, é considerado natural, qualquer pigmento extraído diretamente de compostos vegetais ou animais, sendo que os principais são:

- Açafão
- Antocianinas
- Carmim
- Carvão
- Clorofila
- Hemoglobina
- Urucum

C.II- Sintéticos

É definido como artificial qualquer corante com composição química definida,

resultante de diversos processos químicos e físicos, para esse tipo de corante fica explicitamente necessário a declaração de “Colorido Artificialmente”.

A legislação permite o uso de até três corantes na mesma solução, por exemplo, para se obter a cor roxa em refrescos de uva é utilizado o corante Azul brilhante combinado com o *Bordeaux*. Em alimentos determinados, é possível usar 0,01 % de corantes sintéticos, com exceções de alimentos congelados, no qual é usado 0,05 % de corante (ABIA, 1989).

C.III- Sintéticos Idênticos ao Natural

Citado pela primeira vez no Conselho Nacional de Saúde em 1988, é definido como idêntico ao natural por ser desenvolvido em laboratório e visa obter as mesmas estruturas químicas do natural. Sendo os principais:

- beta – caroteno
- beta-apo-8'-carotenol
- Riboflavina
- xantofila.

São utilizados em alimentos como extratos de cenoura, açafrão em pó, extrato de tomate e pimenta em pó (SATIKO,1992).

C.IV- Inorgânicos

Compreendem Pigmentos formados por Alumínio, Cálcio, Ferro, Titânio e metais pesados. O uso desse tipo de classe varia muito, sendo utilizado em diversas indústrias, como na de higiene oral, o uso do corante branco proveniente do carbonato de cálcio, que possui chumbo em sua composição. Nas indústrias de cosméticos o uso abrangente das derivações do óxido de Ferro como o FeO, FeO₃, e sulfato ferroso, proporcionando cores na faixa do amarelo, ocre e marrom, a cor é ligada diretamente com o tipo de precipitação e oxidação do Ferro, também pode ser utilizado em comidas e remédios, não podendo exceder 0,25% por kg de massa corpórea (MARMION, 1991).

C.V – Caramelo

Pigmento mais popular e antigo usado atualmente, sua cor varia de preto a marrom-escuro, sendo processado pelo tratamento térmico dos carboidratos com temperatura, pressão, pH e concentração controlados.

As principais fontes desse composto são o açúcar, melaço, açúcar invertido, porém o mais utilizado é o amido hidrolisado pois contém uma grande concentração de dextrose, sendo esse o fator mais importante para um corante caramelo de alta qualidade. São divididos em quatro classes, separados de acordo com o tipo de seu processamento:

- Corante caramelo puro
- Corante caramelo sulfito cáustico
- Corante caramelo processo de amônia
- Corante caramelo processo sulfito amônia

Este tipo de corante é utilizado principalmente em refrigerantes, pães, bolos carnes, molhos e café torrado (WILLIAMSON, 1999).

3.5 Antocianinas

A palavra Antocianinas é derivada de duas palavras gregas, *anthos*, flor e *kyanos* que significa azul. Descoberta por Sir Robert Robinson e Professor Richard Willstatter que ganharam o prêmio Nobel de Química por seus trabalhos com pigmentos em plantas. As antocianinas são consideradas o segundo grupo mais importante dentro do quadro de pigmentos naturais, ficando atrás da clorofila (HARBORNE, 1988).

Desempenham diversas funções nas plantas, como proteger da luz solar, ações antioxidantes e principalmente no papel reprodutor das plantas, pois produzem cores que chamam a atenção dos agentes polinizadores (LÓPEZ, 2000).

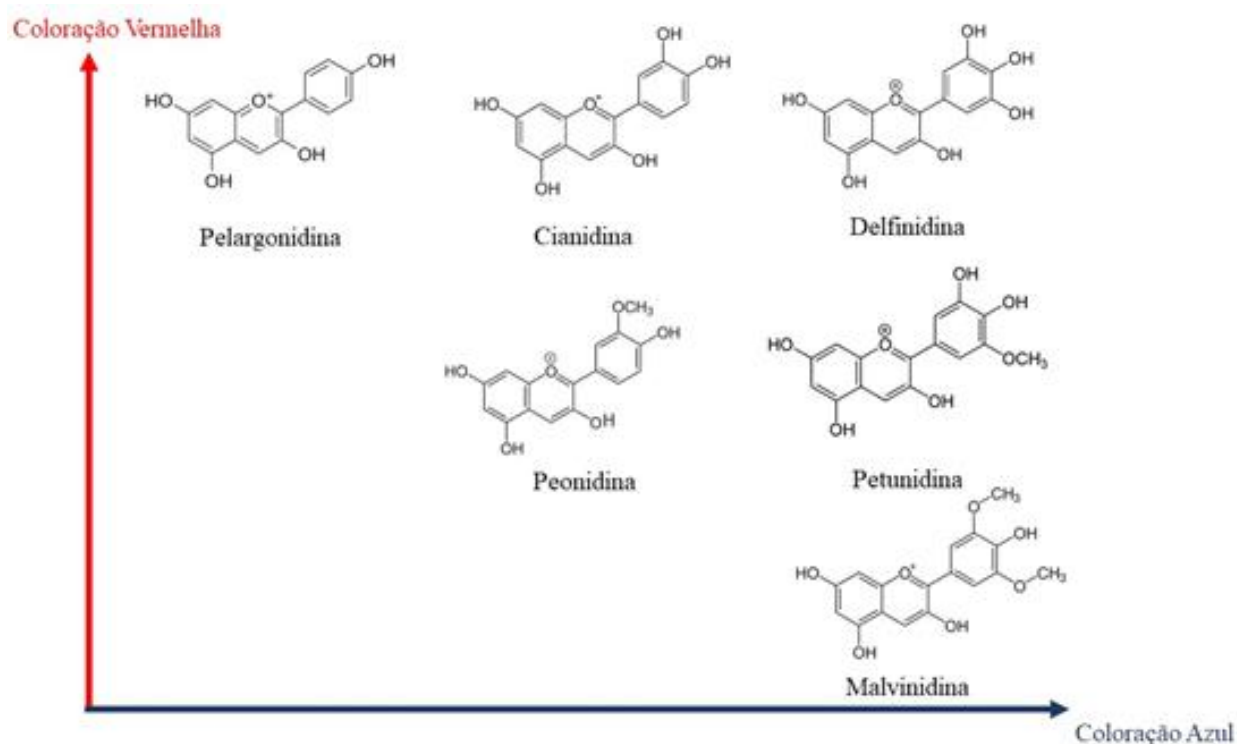
As antocianinas são consideradas como o conjunto de pigmentos mais amplamente distribuído no universo das plantas. Responsáveis por uma extensa gama de colorações, incluindo azul, roxo, violeta, magenta e vermelho. Pertencente ao subgrupo dos flavonoides, no qual pertencem ao grande grupo dos componentes fenólicos (FENNEMA, 2008). Os diferentes grupos de flavonoides com suas respectivas colorações podem ser observadas na Figura 4.

A estrutura das antocianinas é formada por um esqueleto $C_6C_3C_6$ e por isso pertencem ao grupo flavonoide. A coloração de cada componente depende basicamente da presença e do número de substituintes ligados à molécula. A estrutura básica das antocianinas é 2-fenilbenzopirílio, e possuem certas diferenças relacionadas aos compostos ligados nas seguintes posições: 3' (R1), 4' (R2), 5' (R3), 3 (R4), 5 (R5), 6 (R6) e 7 (R7), que podem ser átomos de hidrogênio, hidroxilas ou metoxilos. As estruturas químicas das antocianinas e dos flavonoides podem ser observadas na Figura 5 (FENNEMA, 2008).

Quando analisadas em soluções aquosas é possível encontrar uma mistura de diferentes estruturas em equilíbrio, o cátion flavilium (flavonoides) de coloração vermelha, base anidra quinoidal (quinina) coloração predominante azul, chalcona (cetona) que é incolor e base carbitol (álcool), também incolor. Pelo fato das antocianinas ser um composto relativamente instável, vários fatores podem levar a sua degradação, ocorrendo a partir do momento que é

extraída da planta, durante processo de fabricação do pigmento e na estocagem, sendo que os principais fatores para sua degradação são a variação de pH, temperatura e concentração de Oxigênio (HEREDIA et al., 1998).

Figura 4 - Antocianinas mais comuns em alimentos arranjadas pelo aumento da coloração vermelha e azul.



Fonte- adaptado de Fennema's Food Chemistry (Damodaran, 2008)

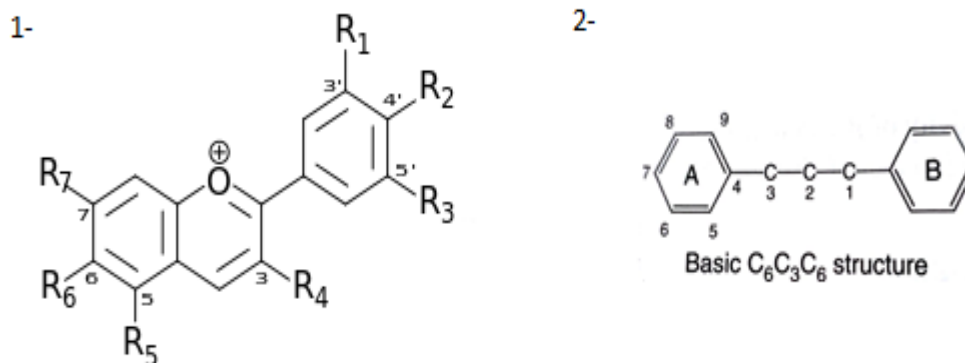
Em pH menor que 2, se apresentam na forma catiônica, mudando o pH da solução para básico, ocorre desprotonação e formação da base quinoidal. Em sistemas aquosos o cátion flavilium é hidratado o que gera o equilíbrio do carbitol com a chalcona (PASCUAL-THERESA; SANCHEZBALLESTA, 2008).

Com variações na temperatura, também gera desequilíbrios, favorecendo a formação da base chalcona, o que retira a coloração da solução, visto que a chalcona é incolor (HEREDIA, 1998).

Nos alimentos coloridos com a antocianina estão presentes basicamente os seguintes compostos, petudina, malvidina, cianidina e pelargonidina, todos pertencentes ao conjunto das antocianinas, porém devido a baixa estabilidade da cianidina e pelargonidina, ocasionada principalmente pelos grupos reativos hidroxila, o qual não participam de outras ligações

químicas, diferentemente da petudina e malvidina (FENNEMA, 2008).

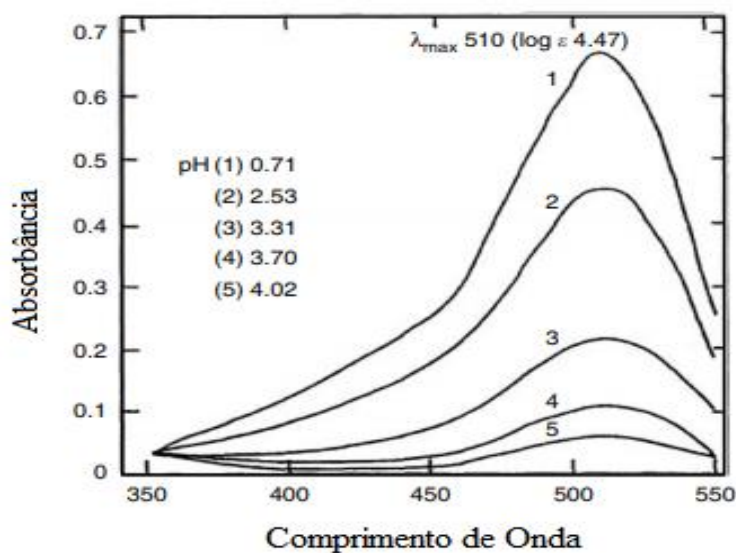
Figura 5 – 1- Estrutura básica das antocianinas; 2- Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: Fennema's Food Chemistry (Damodaran, 2008)

Os efeitos do pH na coloração das antocianinas podem ser observados nos espectros de absorção da cianidina em soluções ácidas que variam de 0,71 até 4,02, representado na Figura 6 (FENNEMA, 2008).

Figura 6- Espectro de absorção da cianidina em pHs diferentes.



Fonte: adaptado de Fennema's Food Chemistry (Damodaran, 2008)

A extração desse pigmento ocorre principalmente da seguinte forma, empregando o ácido clorídrico diluído em metanol contendo 0,001% v/v HCl no material que contém o pigmento, como por exemplo a casca da uva, porém por serem compostos tóxicos e corrosivos,

é aconselhado o uso de ácidos fracos como o acético e realizar controles de pH durante a extração (BRIDLE, 1997).

Para conseguir atingir a estabilidade, Hilton descreve o uso de ultrafiltração no extrato com uma membrana semipermeável para efetuar a separação, retendo assim a antocianinas (HILTON, 1982).

Com o aumento intensivo das buscas por alimentos saudáveis a antocianinas ganha força no mercado industrial, visto que estudos apontam seus benefícios a saúde humana por apresentar propriedades anti-inflamatórias. Sua comercialização ocorre principalmente na forma líquida ou em pó, como mostrado na Figura 7, geralmente obtidos da casca de uva, repolho e açaí. (TENG et al., 2017).

Figura 7- Antocianinas em pó



Fonte: Própria

3.6 Juçara

Euterpe edulis é a palmeira na qual se obtém o fruto que fornece a antocianinas, uma palmeira proveniente da floresta tropical do Brasil, seu perímetro de extensão vai do sul da Bahia ao Rio Grande do Sul, existindo registros de plantações no Paraguai e Argentina. Além da fruta, essa palmeira também é utilizada de forma imprudente para a extração do palmito, visto que uma vez extraído da planta não há possibilidades da sua reconstituição e consequentemente há a perda da árvore e do território da plantação (CONTE, 2004).

Os frutos maduros apresentam coloração preta, considerados carnosos com aproximadamente 1g por fruta, sendo que uma árvore pode gerar usualmente 5kg de frutos

(REIS, 1995). A árvore de juçara está representada na Figura 8.

Figura 8 - Árvore de juçara



Fonte: Agência USP de notícia

A disseminação das sementes da juçara ocorre principalmente por animais que consomem os frutos durante o verão e primavera. Com uma produção anual de 300.000 frutos no ano, os animais afetam diretamente no reflorestamento da mata atlântica e da cadeia alimentar dos animais (REIS; KAGEYAMA, 2000).

A colheita se inicia no momento em que os frutos começam a obter uma coloração parecida com o vinho, tendo um ponto ótimo quando o fruto obtém uma cor próxima ao preto, essa cor só é obtida pela presença das antocianinas no fruto. A polpa obtida da palmeira pode partir de dois diferentes gêneros, *Euterpe edulis* na floresta amazônica, conhecida como juçara, e na floresta Amazônica conhecida como *Euterpe oleracea*, usualmente chama de açazeiro (SCHULTZ, 2008).

O uso dos frutos da juçara é de grande extensão, no sudeste e sul é consumido na forma de sobremesas e sucos, porém no Nordeste é consumido juntamente com a comida, ou misturada com alguma outra polpa de outra fruta, como o cacau. Seu uso está apresentando um relativo aumento nos últimos anos por ter um sabor mais adocicado que o açaí (MAC FADDEN, 2005).

O processo da polpa da juçara é proveniente das tradições indígenas que consomem o fruto há anos. Essa metodologia foi personalizada para as indústrias para obter uma melhor conservação e também um menor desperdício do fruto visto que apenas 15% do peso da fruta é aproveitável (ROGEZ, 2000). A Figura 9 apresenta a polpa da juçara separada de sua semente.

Figura 9- Polpa da Juçara



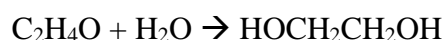
Fonte: Jornal “O Imparcial – Maranhão”, 2017

Através de um congelamento em câmara fria é possível manter a polpa da juçara conservada para assim seguir seu transporte. Sua extração tem como próximo passo uma pasteurização que visa aumentar a validade do produto além de proporcionar uma higienização do produto (HUBINGER, 2004).

A polpa da juçara é definida como um produto sem adição de água e sem ter passado previamente por peneiras, portanto a polpa contém valores a partir de 40% de sólidos totais. (BRASIL, 2000).

3.7 Polietilenoglicol

Chamado de forma abreviada como PEG, é um polímero resultante da polimerização do óxido de etileno com a água, catalisado tanto por base ou em meios neutros.



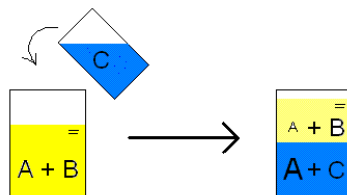
Sua produção obtém níveis elevados de rendimento caso realizado sob altas temperaturas e em pH ácido ou neutro, podendo ter um percentual de 90% em seu coeficiente de rendimento. Sua reação libera além do polietilenoglicol, o dietileno glicol, trietileno glicol e o tetraetileno glicol (VIA FARMA, 2013).

Na Figura 10, tanto a estrutura química do polietilenoglicol quanto os elétrons disponíveis para ligações podem ser observados.

A influência da Massa molar na partição das antocianinas afeta diretamente no rendimento do processo. Zaslavsky observou que polímeros com maior massa molar necessita

formada majoritariamente de água (ASENJO, 2011).

Figura 11: Extração Líquido-Líquido



Fonte: Adaptado *Electrochemistry Communications* (Scholz, 2000)

Quando as duas fases se separam é possível garantir que há um equilíbrio termodinâmico presente na solução, sendo este necessário para a extração de vários compostos biológicos como o DNA por se assemelhar as propriedades químicas do corpo humano, que é constituído de forma predominante de água (PESSOA, 2005).

As indústrias biológicas e bioquímicas na sua grande maioria preferem o uso do SAB por ser um método eficiente para purificar substratos. Usualmente é feita a escolha de solventes orgânicos, porém o mesmo resultado também pode ser obtido ao se usar polímeros com a vantagem de não causar incompatibilidade com a amostra (TJERNELD, 1986).

Para se formar um SAB com polímero é necessário usar uma concentração acima da crítica, tanto para um sistema polímero – água quanto para polímero – sal. Cada sistema gera uma curva de equilíbrio única, que possui as informações de composição de cada componente em equilíbrio (DIAMOND & HSU, 1992).

As antocianinas são obtidas da matéria prima por meio de uma extração com solventes orgânicos, normalmente utiliza-se uma solução contendo etanol ou metanol (JU; HOWARD, 2003).

Estudos realizados em 2011 visavam a obtenção de antocianinas a partir da polpa da amora, para tal pesquisa foi utilizado um sistema aquoso bifásico de etanol e sulfato de amônio. Com variações em suas propriedades intensivas foi possível observar o comportamento das antocianinas. Wu (2011) notou que ao formar SABs com etanol houve separação de fases, movimento não formando quando se utilizou metanol, por suas propriedades serem semelhantes à da água. Em seu trabalho, Wu (2011) registrou qual foi o ponto no qual houve maior separação de fases, ocorrendo no pH = 4,5 com o sistema aquoso bifásico formado por 10% de suco de amora, 20% de sulfato de amônio, 30% de etanol e 40% de água. Essa extração obteve 89,5% das antocianinas na parte superior do sistema (WU, et al., 2011).

Com este estudo se torna pertinente a escolha certa para o solvente, visto que é necessária a escolha do composto que tenha uma maior afinidade com o material desejado (SEADER et al, 2011). O Grau de separação deste material pode ser quantificado comparando a concentração do composto na fase de topo em relação a fase do fundo, segundo a Equação:

$$\beta = \frac{\frac{(ya)^{Topo}}{(ya)^{Fundo}}}{\frac{(yc)^{Topo}}{(yc)^{Fundo}}} \quad 1$$

No qual:

(ya)topo = fração do composto a no topo

(yc)topo = fração do composto c no topo

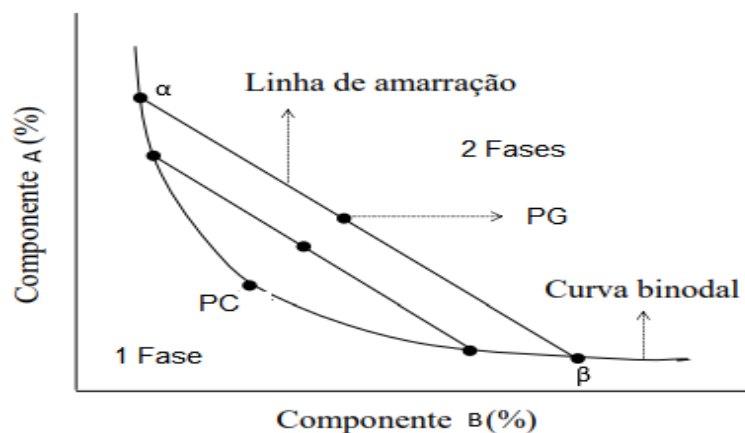
(ya)fundo = fração do composto a no fundo

(yc)fundo = fração do composto c no fundo

Para que o grau de separação seja alto, o solvente deve ter uma grande afinidade com o soluto, caso a solubilidade do soluto no solvente não seja grande, será necessário acrescentar uma maior quantidade de solvente, tornando o processo caro e inviável (SEADER et al, 2011).

Para a utilização do sistema aquoso bifásico é necessário o uso de uma ferramenta que possa indicar as concentrações dos componentes na fase de topo e fundo no equilíbrio, portanto, o uso do diagrama de fases, representado na Figura 12, se torna necessário para análises das concentrações das diferentes fases.

Figura 12 – Diagrama de fases dos componentes A e B



Fonte: adaptado do Seader (2011)

O componente A representa o material em maior quantidade no topo, enquanto o B é mais representativo no fundo. A curva binodal representa a linha na qual acima desta existem duas fases distintas e abaixo da curva não há separação de fases. O ponto PG apresenta a concentração total do sistema, este ponto é ligado pelas linhas de amarração, que interliga os pontos ALFA e BETA, que representa as concentrações em percentagem (massa/massa) da fase no topo e fundo, respectivamente. O ponto PC, chamado de Ponto crítico apresenta teoricamente volumes e composições iguais de ambas as fases (SEADER et al, 2011).

Segundo Zaslavsky (1995) alguns fatores podem fazer com que o grau de separação aumente significativamente. Em sistemas formados por polímero – sal ocorre o fenômeno chamado de *salting-out*, no qual o sal ocupa o lugar das substâncias solúveis em água, isso ocorre pois ao entrar em contato com a água, o sal se separa em ânions e íons e quanto mais sal é adicionado ao sistema, mais ânions se tornam insolúveis em água. Com este efeito os sais perdem espaço para os outros componentes, tornando o sistema bifásico. Este tipo de SAB possui uma grande diferença de densidade o que é benéfico para a separação de fases, além de apresentar um baixo custo (ZASLAVSKY, 1995).

Para a molécula de Polietilenoglicol, as interações polímero-sal são feitas a partir do átomo de Oxigênio com ligação livre no polímero com os cátions existentes no sal, portanto em uma das fases polímero e cátion interagem. (CARVALHO, 2007).

O PEG compõe a fase mais leve do sistema e a fase mais pesada é composta pelos sais, ambas possuem a água como solvente, uma média de 80% de solvente em cada fase. Este tipo de sistema é amplamente utilizado para biomoléculas por oferecer um ambiente mais favorável para biomoléculas, pois evita mudança estrutural e perda da atividade biológica (SCHMIDT, VENTOM, ASENJO, 1994)

Além do ponto de vista biológico, existem pontos positivos na visão industrial, por possuir menor custo com reagentes, apresenta uma rápida separação de fases, não é tóxico e possui uma ampla faixa de aplicação em diferentes proteínas (RAGHAVARAO, 1995).

Em 1990 foi realizado um estudo para prever o comportamento do SAB PEG/fosfato, no qual visava entender o equilíbrio do sistema variando a massa molar do Polietilenoglicol. Lee pode concluir que aumentando a massa molar do PEG, menor a concentração exigida para este polímero (LEE, 1990).

3.9 Quantificação do Teor de Antocianinas da Polpa da Juçara

3.9.1 Método do pH diferencial

Existem dois principais métodos para se quantificar as antocianinas, o método de pH Único e o método do pH diferencial, dentre eles o mais utilizados é por meio da diferença de pH. O resultado obtido é definido em termos da quantidade absoluta de antocianina em sua amostra inicial, expressa na forma de mg de antocianinas/100 gramas de amostra (FULEKI & FRANCIS, 1968).

Flavonoides no geral, possuem a característica de absorver luz na região aproximada de 350 a 380 nm, porém, as antocianinas podem absorver fortemente a luz em outra região, estabelecida aproximadamente entre 496 e 550nm (BROUILLARD, 1982). Ciente dessa característica em partículas, a metodologia de quantificação se torna mais fácil, visto que é possível utilizar a espectrofotometria para observar a absorbância da amostra em questão. (WROLSTAD, 1976).

O método de pH diferencial utiliza desta propriedade em específico das antocianinas para, assim, ser possível a quantificação das mesmas nas amostras. O espectrofotômetro realiza uma leitura da amostra em solução tampão em dois pH diferentes, utilizando do fato da absorbância das antocianinas apresentarem grande sensibilidade a mudança de pH (FULEKI & FRANCIS, 1968).

Utilizando da Equação 2, é possível quantificar as antocianinas por diferença de pH.

$$\text{Antocianinas totais} = \frac{DO^* \times V_{E1} \times V_{E2} \times 1000}{V_{alq} \times m \times E_{1cm}^{1\%}} \quad 2$$

DO*: Densidade Ótica do Extrato Diluído, para pH Diferencial DO* é a diferença entre a absorbância nos pH's 4,5 e 1,0.

V_{E1} e V_{E2} : Volume Total do Extrato Concentrado (ml)

V_{Alq} : Volume da Alíquota do Extrato Primário a ser diluída para fazer o Extrato Secundário (ml)

m: Massa de Amostra

100: Fator de Correção para que resultado seja expresso em 100 gramas de Amostra

$E_{1cm}^{1\%}$: Coeficiente de Extinção

10: Constante para correção do Coeficiente de Extinção de modo a expressar o resultado em mg de antocianinas/100 gramas de amostra.

Sendo a Densidade Óptica do extrato diluído a diferença de absorbância da amostra no pH 1 e 4,5 e para o Coeficiente de Extinção adotou-se os valores de 873 e 775 respectivamente para os pHs 1 e 4,5 (FULEKI & FRANCIS, 1968).

3.9.2 Estudos de Partição

Para avaliar o comportamento das antocianinas no SAB utiliza-se do estudo de partição, que quantifica a distribuição do componente de interesse na fase de fundo e topo pelo coeficiente de partição (K), avaliando a concentração do topo em relação ao fundo pela seguinte equação (3) (MEDEIROS et al., 2005).

$$K = \frac{\text{Concentração no topo}}{\text{Concentração no fundo}} \quad 3$$

Obtém-se a razão dos volumes pela razão descrita na equação 4.

$$vr = \frac{V_{\text{topo}}}{V_{\text{fundo}}} \quad 4$$

O fator de purificação (FP) fornece a purificação das antocianinas em relação a massa inicial de antocianinas. Este fator pode ser calculado segundo a equação 5.

$$FP = \frac{CA}{CA_f} \quad 5$$

CA: Concentração de antocianinas inicial

CA_f: Concentração de antocianinas no topo

A purificação pode ser obtida tanto para a fase de fundo quanto para a fase do topo (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

A recuperação (RP) de antocianinas pode ser calculada segundo a equação 6, que mostra o percentual de antocianinas na fase analisada em relação ao extrato inicial (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

$$RP = \frac{CA_f \times V_f}{CA_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}}} \quad 6$$

CA_{inicial}: Concentração inicial de antocianinas

Vf: Volume da fase em análise (ml)

V_{inicial}: Volume inicial da amostra. (ml)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Através do Projeto Juçara, da cidade de Ubatuba -SP, obteve-se a polpa da juçara que foi previamente lixiviada e em seguida, enviada para o laboratório de Compostos Bioativos de Alimentos da UNIFESP – Baixada Santista.

4.2 Extração de Antocianinas

4.2.1- Extração Padrão ou Convencional

Como as antocianinas são moléculas polares, utilizou-se solução de metanol acidificado com 0,5% de HCl para extrair as antocianinas. Em geral o processo é realizado em meio ácido, para prevenir a oxidação e aumentar a estabilidade dos pigmentos nos extratos (CACACE e MAZZA, 2003; POMPEU et al., 2009). As amostras foram então avaliadas no espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm (FULEKI & FRANCIS, 1968).

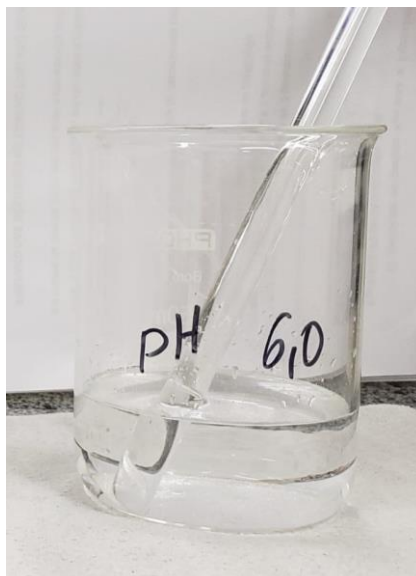
4.2.2 Extração por SAB

Baseado no trabalho de Minami (1997), três diferentes massas molares do polietilenoglicol foram escolhidas para a análise da extração de antocianinas, 1500, 6000 e 8000/mol. Todos os sistemas foram preparados com pH 6,0. Para efeitos avaliativos, a eficiência da extração foi comparada com as curvas binodais descritas por Silva (2009).

4.3 Preparo do tampão

O preparo da solução tampão foi baseada de acordo com o pH requerido para os experimentos. Para o pH 6,0 utilizou-se uma porcentagem de 30% m/m constitui-se dos sais monobásico de potássio e dibásico de potássio, e 70% de água miliQ, ocasionando uma solução com 100 g totais, no qual 16,97g são do sal monobásico, 13,03g de sal dibásico e 70g de água MiliQ. A figura 13 mostra a solução tampão após preparo.

Figura 13: Solução tampão com pH 6,0



Fonte: Própria

Para as análises do método do pH diferencial, preparou-se dois tampões com pH 1 e 4,5, constituídas de soluções de KCl (0,2N) e HCl (1N) com proporção de 25/67 para o pH 1, e para o pH 4,5 uma solução com Acetato de Sódio (1N), HCl e água na proporção 100/60/90 (FULEKI & FRANCIS, 1968).

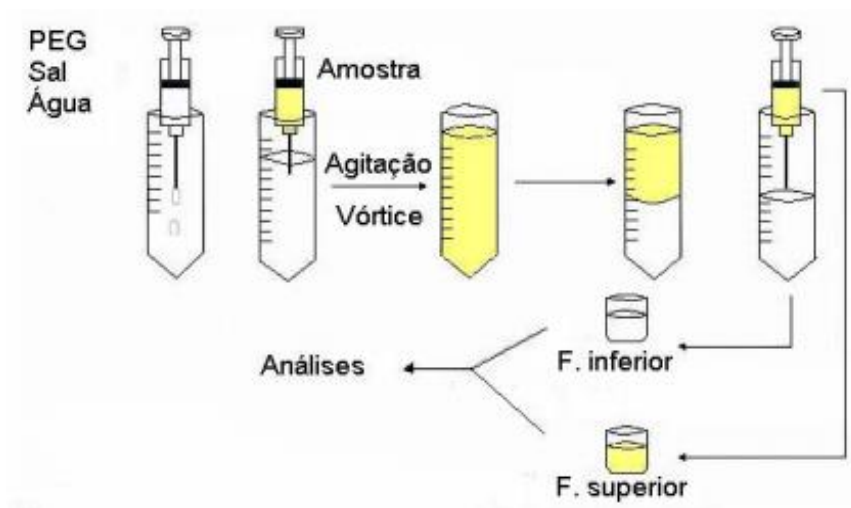
4.4 Preparo do Sistema Aquoso Bifásico

Tubos graduados de centrífuga foram preenchidos com o Sistema aquoso bifásico, no qual é constituído de uma solução formada com o PEG, água miliQ e tampão. Preparou-se os tubos de acordo com as curvas binodais respectivas ao pH 6 e as massas molares previamente escolhidas, de forma a conter 9,9 g totais no tubo graduado. Escolheu-se 8 pontos em cada uma das três diferentes curvas binodais, de forma que os pontos escolhidos abrangessem toda a extensão da curva. Para cada ponto escolhido preparou-se uma duplicata do SAB, uma que contivesse a amostra de juçara contendo antocianinas e a outra, intitulada de branco, sem a presença de juçara no sistema.

A solução formada permaneceu em banho maria por 24 horas, mantido a 37 °C. Após repouso, os tubos foram separados em dois grupos, os que obtiveram distinção e fases e os que não obtiveram. Os tubos sem distinção foram descartados para futuras análises, logo, os pontos correspondentes a esses tubos foram ignorados. Os tubos que continham mais de uma fase receberam 0,1g de juçara liofilizada e levados para a centrífuga por 10 segundos, após centrifugação as amostras permaneceram em repouso para que as fases de topo e fundo fossem formadas. Após completa separação, com a ajuda de uma seringa separou-se alíquotas de cada

fase, para que então, fosse determinado a concentração de antocianinas em cada fase, demonstrado pela figura 14.

Figura 14 - Esquema de extração das fases topo e fundo



Fonte: PORTO, 2004

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Extração por Sistema Aquoso Bifásico

De acordo com as curvas binodais descritas por Minami (1997) foram escolhidos 8 pontos para a análise da extração das antocianinas. Estes pontos foram escolhidos de forma a abranger a curva binodal como um todo. As composições dos pontos escolhidos para cada curva estão demonstradas nas tabelas 4,5 e 6.

Tabela 4 – Pontos na região bifásica escolhidos a partir da curva binodal para extração das antocianinas de juçara para os experimentos utilizando o PEG 1500 e pH 6.

Ponto	%PEG	%Fosfato
1	36%	6%
2	36%	10%
3	28%	10%
4	28%	14%
5	20%	12%
6	20%	16%
7	12%	18%
8	4%	20%

Tabela 5 – Pontos na região bifásica escolhidos a partir da curva binodal para extração das antocianinas de juçara para os experimentos utilizando o PEG 6000 e pH 6.

Ponto	%PEG	%Fosfato
1	36%	8%
2	36%	12%
3	28%	8%
4	28%	14%
5	20%	10%
6	20%	14%
7	12%	16%
8	4%	16%

Tabela 6 – Pontos na região bifásica escolhidos a partir da curva binodal para extração das antocianinas de juçara para os experimentos utilizando o PEG 8000 e pH 6.

Ponto	%PEG	%Fosfato
1	14%	23%
2	24%	23%
3	12%	30%
4	26%	30%
5	19%	30%
6	35%	5%
7	25%	15%
8	20%	20%

As composições de cada SAB para as massas molares 1500, 6000 e 8000 podem ser observadas respectivamente nas tabelas 7, 8 e 9. As composições foram avaliadas de acordo com os percentuais de cada um dos 8 pontos escolhidos para cada massa molar diferente de PEG. Para cada ponto a seguir, o experimento foi realizado em triplicata. Nas quais, 1.1, 2.1, 3.1 e assim por diante, se refere ao ponto escolhido na curva binodal com acréscimo de 0,1 de polpa de juçara.

E as amostras nomeadas como 1.B, 2.B, 3.B foram denominadas como branco de cada condição experimental, no qual não receberam a polpa da Juçara e serão usadas para verificar se há interferência em relação as amostras com a polpa.

Após inclusão da polpa nos tubos, os sistemas foram agitados e centrifugados a 60 rpm/min. A figura 15 demonstra os sistemas antes da inclusão da polpa, com a polpa, e após separação de fase (esquerda para direita).

Para os pontos listados acima, escolheu-se 3 pontos diferentes para cada massa molar de PEG para prosseguir com as análises espectrofotométricas. Os 3 pontos para cada massa de

polietilenoglicol estão listados na tabela 10.

Tabela 7 – Composição dos pontos na região bifásica escolhidos a partir da curva binodal para extração das antocianinas de juçara para os experimentos utilizando o PEG 1500 e pH 6.

Ponto	PEG(g)	Água MiliQ (g)	Fosfato(g)	Juçara
1.B	3,6	4,9	1,5	-
1.1	3,6	4,8	1,5	0,1
2.B	3,6	3,9	2,5	-
2.1	3,6	3,8	2,5	0,1
3.B	2,8	4,7	2,5	-
3.1	2,8	4,6	2,5	0,1
4.B	2,8	3,7	3,5	-
4.1	2,8	3,6	3,5	0,1
5.B	1,2	5,8	3,0	-
5.1	1,2	5,7	3,0	0,1
6.B	2,0	4,0	4,0	-
6.1	2,0	3,9	4,0	0,1
7.B	1,2	4,3	4,5	-
7.1	1,2	4,2	4,5	0,1
8.B	0,8	4,2	5,0	-
8.1	0,8	4,1	5,0	0,1

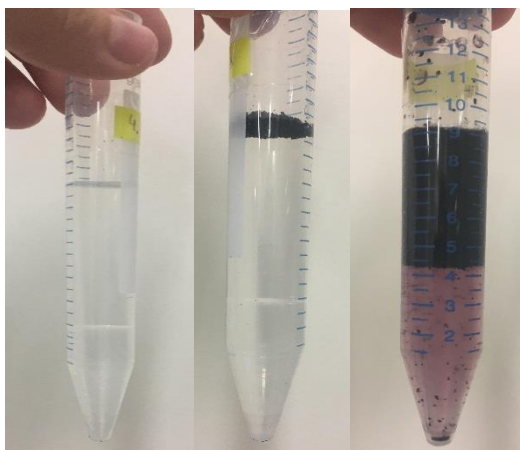
Tabela 8 – Composição dos pontos na região bifásica escolhidos a partir da curva binodal para extração das antocianinas de juçara para os experimentos utilizando o PEG 6000 e pH 6.

Ponto	PEG(g)	Água MiliQ (g)	Fosfato(g)	Juçara
1.B	3,6	4,4	2,0	-
1.1	3,6	4,3	2,0	0,1
2.B	3,6	3,4	3,0	-
2.1	3,6	3,3	3,0	0,1
3.B	2,8	5,2	2,0	-
3.1	2,8	5,1	2,0	0,1
4.B	2,8	3,7	3,5	-
4.1	2,8	3,6	3,5	0,1
5.B	2,0	5,5	2,5	-
5.1	2,0	5,4	2,5	0,1
6.B	2,0	4,5	3,5	-
6.1	2,0	4,4	3,5	0,1
7.B	1,2	4,8	4,0	-
7.1	1,2	4,7	4,0	0,1
8.B	0,4	5,6	4,0	-
8.1	0,4	5,5	4,0	0,1

Tabela 9 - Composição dos pontos na região bifásica escolhidos a partir da curva binodal para extração das antocianinas de juçara para os experimentos utilizando o PEG 1500 e pH 6.

Ponto	PEG(g)	Água MiliQ (g)	Fosfato(g)	Juçara
1.B	1,4	2,3	6,3	-
1.1	1,4	2,3	6,2	0,1
2.B	2,4	2,3	5,3	-
2.1	2,4	2,3	5,2	0,1
3.B	1,2	3,0	5,8	-
3.1	1,2	3,0	5,7	0,1
4.B	2,6	3,0	4,4	-
4.1	1,9	3,0	4,3	0,1
5.B	1,9	3,0	5,1	-
5.1	1,9	3,0	5,0	0,1
6.B	1,9	3,0	5,1	-
6.1	1,9	3,0	5,0	0,1
7.B	1,9	3,0	5,1	-
7.1	1,9	3,0	5,0	0,1
8.B	1,9	3,0	5,1	-
8.1	1,9	3,0	5,0	0,1

Figura 15 – SAB antes do incremento da polpa de juçara; SAB após incremento da polpa de juçara; SAB após descanso de 24h depois do acréscimo da polpa de juçara.



Fonte – Própria

Tabela 10 – Pontos na região bifásica escolhidos a partir da curva binodal para extração das antocianinas de juçara para análises espectrofotométricas.

PEG 1500	PEG 6000	PEG 8000
6	4	1
7	5	2
8	7	5

As triplicatas de cada ponto selecionado permaneceram em descanso por 10 minutos e então foram separadas em solução topo e fundo com o auxílio de uma seringa, para que o equilíbrio do tubo não fosse perturbado. Nas tabelas 11 e 12 observa-se os volumes obtidos para cada ponto de cada massa molar analisada, separados em fundo e topo e a média respectiva de cada ponto.

Tabela 11- Volume do fundo obtido das triplicatas do SAB dos pontos escolhidos para cada massa molar de PEG.

Amostra	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Média
1 PEG 1500	2,6	2,8	2,5	2,6
2 PEG 1500	3,9	3,9	3,6	3,8
3 PEG 1500	6,2	6,6	5,9	6,2
1 PEG 6000	2,2	2,2	2,2	2,2
2 PEG 6000	1,8	1,9	2,1	1,9
3 PEG 6000	3	3,1	3,1	3,0
1 PEG 8000	0	0	0	0
2 PEG 8000	1,6	1,6	1,6	1,6
3 PEG 8000	2,6	2,4	0	1,6

Tabela 12- Volume do topo obtido das triplicatas do SAB dos pontos escolhidos para cada massa molar de PEG.

Amostra	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Média
1 PEG 1500	6,2	6,1	6,4	6,2
2 PEG 1500	4,9	5	5,2	5
3 PEG 1500	2,7	2,2	2,9	2,6
1 PEG 6000	6,6	6,6	6,9	6,7
2 PEG 6000	7,3	7,1	6,9	7,1
3 PEG 6000	5,9	5,8	5,9	5,8
1 PEG 8000	9,2	9,1	9,1	9,1
2 PEG 8000	7,3	7,4	7,4	7,3
3 PEG 8000	6,4	6,5	9	7,3

Para os dados acima seguiu-se com as análises para determinação do teor de antocianinas, e para tal, utilizou-se a equação 2 que apresenta o conteúdo total de antocianinas em mg/100g. Os valores apresentam-se na tabela 13.

Observa-se uma maior quantidade de antocianinas no topo do sistema aquoso bifásico, por constituir majoritariamente de PEG, é denominado como hidrofóbico. essa movimentação deve-se ao fato de que a fase abundante em polímero no tubo possui cátion interagindo com polímeros, no qual forma-se complexos entre o cátion e os pares de elétron livres de Oxigênio, isso torna as antocianinas mais estáveis na fase rica em polímero (SILVA; LOH, 2000). Para

as amostras listadas acima, observa-se que as amostras com PEG 6000 no topo possuem maiores concentrações de antocianinas.

Tabela 13- Concentração média de antocianinas no topo e fundo das amostras via extração SAB para os pontos escolhidos para o PEG 1500, 600 e 8000.

Amostra	FUNDO	TOPO
1PEG 1500	0,0	646,2
2 PEG 1500	321,2	673,7
3 PEG 1500	75,3	401,3
1 PEG 6000	0,0	751,4
2 PEG 6000	7,9	563,0
3 PEG 6000	3,9	723,7
1 PEG 8000	0,0	437,0
2 PEG 8000	3,6	695,7
3 PEG 8000	17,8	613,0

5.2 Extração por Método Convencional

Extração com metanol acidificado foi realizado em triplicata para avaliar a eficácia dos métodos utilizados neste trabalho, os extratos recuperados destes sistemas foram posteriormente avaliados no espectrofotômetro e enfim avaliados segundo a equação 2. Os resultados obtidos estão expostos na tabela 14.

Tabela 14- Quantidade média de antocianinas via extração convencional (MeOH).

Método	ANTmédia (mg/100g)
MeOH	409,8

Analisando os resultados obtidos da Concentração média de antocianinas via extração SAB e por Metanol, percebe-se que por SAB obtém-se uma maior quantidade de antocianinas para todos as massas molares de polietilenoglicol e principalmente para o PEG 6000 que possui uma média de concentração de 679,4mg /100g. De acordo com Coimbra et al (2003) uma maior concentração de antocianinas no topo do sistema é influenciada pela temperatura de operação, no qual o aumento da temperatura resulta em uma maior concentração no topo, assim como a massa molar do PEG também influencia na concentração de antocianinas.

5.3 Estudo de Partição

Para as análises da extração de antocianinas, usou-se os estudos de partição para então averiguar quais fatores são determinantes na extração das antocianinas. Para tal utilizou-se as equações 3, 4, 5 e 6 para determinar o coeficiente de partição, razão dos volumes, fator de purificação e fator de recuperação respectivamente. Os resultados estão representados nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15- Fator de purificação e recuperação de antocianinas na fase fundo para os pontos escolhidos para o PEG 1500, 600 e 8000.

Amostras	Ponto	PEG	%SAL	%PEG	FP	RP (%)
1	6	1500	20	16	0	0
2	8	1500	12	18	0,08	28,2
3	7	1500	4	20	0,18	10,8
1	4	6000	28	14	0	0
2	5	6000	20	10	0,02	0,41
3	7	6000	12	16	0,009	0,30
1	1	8000	14	23	0	0
2	2	8000	24	23	0,008	0,14
3	5	8000	19	30	0,04	0

Tabela 16- - Fator de purificação e recuperação das antocianinas na fase topo para os pontos escolhidos para o PEG 1500, 600 e 8000.

Amostras	Ponto	PEG	%SAL	%PEG	FP	RP(%)
1	6	1500	20	16	1,6	100,9
2	8	1500	12	18	1,6	85,5
3	7	1500	4	20	0,1	28,4
1	4	6000	28	14	1,8	126,5
2	5	6000	20	10	1,4	94,8
3	7	6000	12	16	1,8	104,2
1	1	8000	14	23	1,1	97,0
2	2	8000	24	23	1,7	125,6
3	5	8000	19	30	1,5	134,6

Para os resultados de fator de recuperação e purificação obtidos para os pontos escolhidos, nota-se que para o segundo ponto do PEG 1500 obteve os melhores resultados tanto para o fundo como para o topo. Para o PEG 6000 o ponto com maior fator e recuperação é o ponto 2, já para o PEG 8000 o ponto 2 é o escolhido por também obter maior fator de purificação e recuperação. Portanto é possível observar que os melhores resultados são obtidos para as amostras de fase topo e com as maiores massas molares de PEG. O ponto 3 de PEG 8000 obteve um fator de recuperação de 134% e o ponto 1 de PEG 6000 obteve o maior fator de purificação.

A extração de antocianinas em diferentes massas molares e concluiu que para massas molares maiores de polímero necessita de uma menor quantidade do mesmo para que o sistema bifásico se forme, dado que com uma maior quantidade a solubilidade da molécula de interesse tenha menor solubilidade em água e tenha espaço reduzido no fundo da solução (PESSOA, 2005).

Para o estudo do coeficiente de partição e razão volumétrica utilizou-se as equações 3 e 4, os dados se encontram na tabela 17

Tabela 17- Coeficiente de partição e razão volumétrica para fases de topo e fundo.

Amostra	PEG	Vr	Coeficiente de Partição topo (K)	Coeficiente de Partição fundo (K)
1	1500	2,36	0	0
2	1500	1,32	2,1	0,48
3	1500	0,41	0	0,19
1	6000	3,04	0	0
2	6000	3,67	71,0	0,01
3	6000	1,91	184,4	0,005
1	8000	0	0	0
2	8000	4,60	194,9	0,005
3	8000	4,38	34,5	0,03

O coeficiente de partição é capaz de demonstrar como a distribuição do componente de interesse é feita no sistema aquoso, portanto quando o coeficiente resulta em zero, afirma-se que as antocianinas se encontram apenas em uma das fases. Quanto maior o seu valor, menor é a quantidade necessária de solvente no sistema (Wu, 2014).

Os maiores valores de coeficiente foram observados no topo do sistema, portanto é possível afirmar que as antocianinas prevaleceram nesta fase. Nota-se também que os maiores valores são observados nos PEGs 6000 e 8000.

5.4 Influência da Massa Molar na Extração

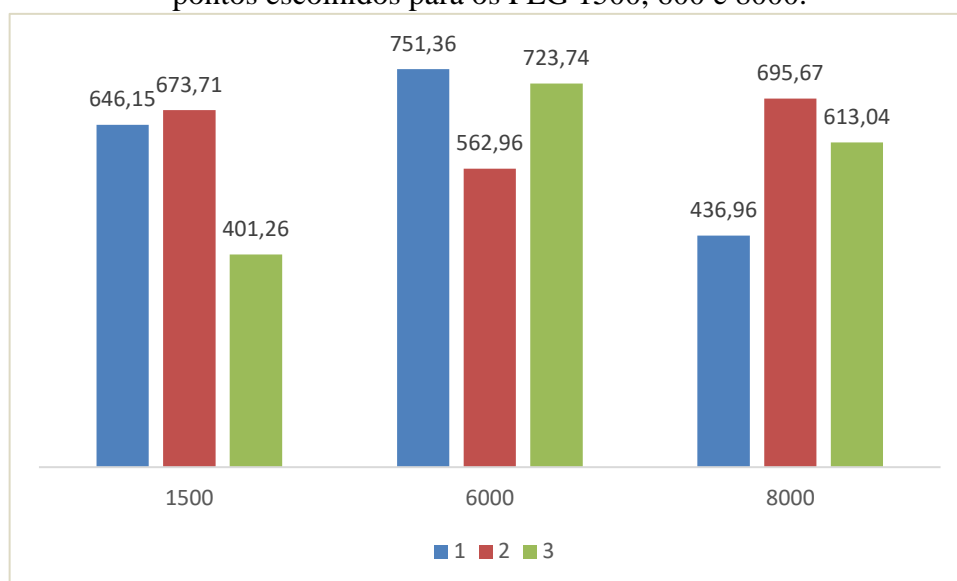
O peso molecular da biomolécula deve ser levado em consideração, visto que o efeito do peso molecular do polímero está vinculado ao da biomolécula, neste caso ao das antocianinas. A partição de biomoléculas de baixo peso molecular não sofre grandes influências pela variação da massa molecular do polímero (ALBERTSSON, 1986). Portanto a variação de massa molecular do polímero estudada neste trabalho não seria notada caso o peso molecular das antocianinas fosse baixo.

A correlação do efeito da concentração de proteína e o coeficiente de partição das

biomoléculas em sistemas PEG/fosfato indicaram que a solubilidade das proteínas na solução de polietilenoglicol/fosfato é regida pelo efeito de exclusão e por interações hidrofóbicas entre proteína e o grupo orgânico etileno presente no polietilenoglicol, grupo no qual é responsável pela alta solubilidade da molécula de interesse na fase rica em PEG (SCHIMIDT,1994).

É possível notar a grande influência da variação da massa molar na extração de antocianinas observando a figura 16.

Figura 16- Influência da Massa Molar na Concentração de Antocianinas na fase topo para os pontos escolhidos para os PEG 1500, 600 e 8000.



Fonte: Própria

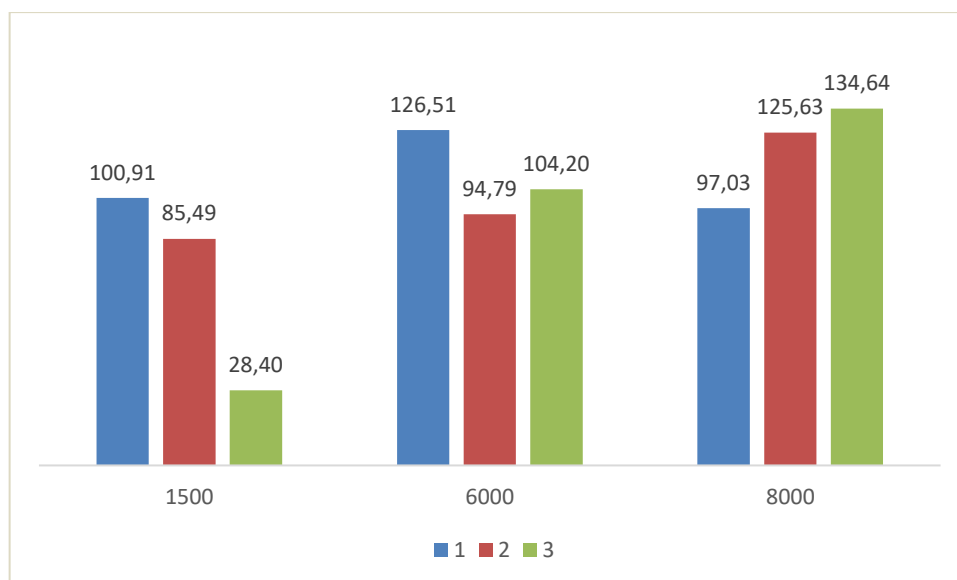
A figura 16 retrata a concentração média de antocianinas nas 3 amostras selecionadas para cada uma das três massas molares no topo das fases, visto que nesta fase é a que mais concentra antocianinas no sistema. Na figura 17, comparou-se o fator de recuperação nos pontos escolhidos para as massas molares 1500, 6000 e 8000.

Analisando o fator de recuperação de cada ponto na fase topo e a concentração média, também nesta fase, observa-se os seguintes dados na tabela 18.

A tabela 18 fornece uma ampla visão de como a massa molar pode interferir na extração de antocianinas. Analisando a média da concentração e o fator de purificação nos três pontos estudados observa-se que os melhores resultados obtidos são para os PEGs 6000 e 8000. A extração de antocianinas é influenciada por diversos outros fatores, no qual podem influenciar não só apenas na concentração das antocianinas após a extração, mas também sua estabilidade e cor final. Os principais fatores limitantes para a extração são o pH, copigmentação,

temperatura entre outros (CHIGURUPATI et al, 2002).

Figura 17- Influência da Massa Molar no fator de recuperação na fase topo para os pontos escolhidos para os PEG 1500, 600 e 8000.



Fonte: Própria

Tabela 18- Média das Concentrações e Fator de Recuperação de Cada Massa Molar de PEG.

PEG	Concentração Média	Fator de Purificação Média
1500	573,7	71,6
6000	679,4	108,5
8000	581,9	119,09

6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mercado de produtos naturais cresceu 12,3% no último ano, este aumento por alimentos mais saudáveis acontece principalmente pelo desejo da população de aderir um estilo de vida mais benéfico para saúde. Devido a este comportamento em massa da população, as indústrias, principalmente as alimentícias estão investindo cada vez mais em produtos que acompanhem essa movimentação, criando produtos menos artificiais e que passem por menos processos químicos.

Os corantes naturais possuem grande participação nessa remodelagem, visto que dos novos produtos alimentícios lançados mundialmente 80% são feitos com corantes naturais.

O tipo de extração utilizada é um fator determinante para as indústrias, visto que o valor gasto com a extração rege o custo do corante natural, portanto, usufruindo de uma extração rápida e com baixo custo o corante natural possui mais uma vantagem em relação ao artificial.

O sistema aquoso bifásico é uma alternativa para substituir os presentes métodos de extração, são baseados nos princípios da química verde, e composto basicamente por água e sais, não tóxicos ao meio ambiente.

As antocianinas foram avaliadas em 3 massas molares diferentes de polietilenoglicol, obtendo resultados para a concentração média, fator de recuperação, purificação e coeficiente de partição.

O PEG 6000 destaca-se pela maior concentração média obtida nos resultados no ponto 1 da amostra de topo (28% PEG, 14% sal).

O PEG 8000 obteve os melhores resultados para o fator de recuperação, no ponto 3 (19% PEG, 30%sal) e coeficiente de partição no ponto 2 (24% PEG, 23% sal).

Em suma, para as condições expostas neste trabalho salientamos o uso de PEG 8000 para extração de antocianinas, por apresentar os melhores resultados de fator de recuperação e coeficiente de partição, além de possuir uma média de concentração média próxima ao PEG 6000.

8. BIBLIOGRAFIA

ALBERTSSON. **Partition of cell particles and macromolecules**, 3 ed, Wiley, New York, 1986

ALEXANDRE, D.; CUNHA, R.L; HUGINGER, M.D. **Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, São Paulo, v. 24, n.1, p. 114-119, 2004.

Anuário estatístico do brasil, Rio de Janeiro, IBGE 1975-1990

ANVISA. **Relação de corantes permitidos. v.1**, disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2954708/Cap%C3%ADtulos+do+Volume+1+-+13+Subst%C3%A2ncias+corantes.pdf/30224e2c-f071-46c0-b415-7e3b0db90823>>

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8826– 8835, 2011.

ASENJO, J.A; SCHMIDT, A.S; HACHEM, F.; ANDREW, B.A. **Model for predicting the partition behavior of proteins in aqueous two-phase system**. Journal of Chromatography A, v.688, n.1, p.47-54, 1994.

BABU, B.R; RASTOGI, N.K; RAGHAVARAO, K.S.MS. **Liquid-Liquid extracion of bromelian and plyphenol oxidase using aqueous two-phase system**. Chemical Engineering and Processing, v.47, n.1, p.83-89, 2008.

BECHTOLD.T. MUSSAK.R . **Handbook of Natural Colorants**. Wiltshire:Willey v.1,2009.

BORZELECCA F.J.; HALLAGAN.B.J. **Safety and Regulatory Status of Food, Drug, and Cosmetic Color Additives**. Washigton: American Chemical Society, 1992. P.337-390

BRASIL. Leis , decretos, etc. Resolução n 22/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. In: Compêndio da legislação de alimentos. Rev. 3. São Paulo: ABIA, 1989. v. 1/A, p. 7.10-7.14.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.F. **Anthocyanins as natural food colours – selected aspects**. Food Chemistry, v.58, n.1-2, p.103-109, 1997.

CACACE, J. E. & MAZZA, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, 59, 379-389.

CARVALHO, C. P., COIMBRA, J. S. R., COSTA, I. A. F., MINIM, L. A., SILVA, L. H. M., MAFFIA, M. C. **Equilibrium Data for PEG4000 + Salt + Water Sistems from (278.15 to**

318.15) K. J. Chem. Eng. Data, v.52, p.351–356, 2007

CHAITANYA LAKSHMI G. **Food Coloring: The Natural Way.** Research Journal of Chemical Sciences, Bangalore, 2014.j

CHIGURUPATI, N.; SAIKI, L.; GAYSER JR., C., **Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use.** International Journal of Pharmaceutics, v. 241, p. 293- 299, 2002.

CHO, Y. J.; HWANG, H. J.; KIM, S. W.; SONG, C. H.; YUN, J. W. **Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by Paecilomyces sinclairii in a batch bioreactor.** Journal of Biotechnology, v. 95, p. 13-23, 2002.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. **Corantes Alimentícios.** B.CEPPA, v. 20, n. 2, 2002.

CONTE,R. **Estrutura genética de populações de Euterpe edulis Mart. Submetidas à ação antrópica utilizando marcadores moleculares e microsatélites.** 2004. 135p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CRQ. **Corantes e Pigmentos.** 2011. Disponível em: <https://www.crq4.org.br/quimicaviva_corantespigmentos> . Acesso em 20 out. 2018.

CUNHA, F. G. **Estudo da Extração Mecânica de Bixina das Sementes de Urucum em Leito de Jorro.** 2008. 92p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008. Orientador: Marcos Antonio de Souza Barrozo

DIAMOND, A .D., HSU, J. T. **Aqueous two phase systems for biomolecule separation,** Advances in Biochemistry Engineering, v. 47, p. 89-135, 1992.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, n. 1, p. 5-22, 2000.

FENNEMA, O.; Damodaran, S.; Parkin, K. **Fennema’s Food Chemistry**, v.4, Flórida: CRC Press, p.599-613, 2008.

FIGUEIREDO, J.G.; DA SILVEIRA BITENCOURT, F.; BESERRA, I.G.; Teixeira, C. S.;

LUZ, P. B.; BEZERRA, E. H.; MOTA, M. R.; ASSREUY, A. M.; DE QUEIROZ CUNHA, F.; CAVADA, B. S.; DE ALENCA, N.M.. **Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice**. N-S Arch Pharmacol, 2009, 380, 5, 407-414.

FILAROWSKI, Andrew. **Perkin's Mauve: The history of the chemistry**. London: Ressonance, 2010. p.850-855.

FULEKI T & FRANCIS FJ; Quantitative Methods for anthocyanins: 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberries juices. **Journal of Food Science**, 1968, 33: 78-83

FULEKI T & FRANCIS FJ (1968a) Quantitative methods for anthocyanins: 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, 1968, 33: 72-77

GARZA-MADRID, M.; RITO-PALOMARES, M.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; BENAVIDES, J. **Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human sérum albumin as proof of concept**. Process Biochemistry, v. 45, p. 1082-1087, 2010

GOLDMAM, Simão. **Psicodinamica das cores**. 4a. ed. Rio de Janeiro: s.ed., 1964 v.1.

GUIMARÃES, Ismenia S.S. **Corantes naturais para alimentos: antocionina de cascas de uvas**. Rio de Janeiro, EMBRAPA/CTAA, Julho 1984. p.30 . (Boletim de Pesquisa, número 11)

HARBORNE, J.B.; GRAYER, R.J., **The anthocyanins. In: The flavonoids: advances in research since 1980**. Chapman & Hall, London, 1988, p. 1-20.

HE, J.; GIUSTI, M. M. **Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties**. Annual Review of Food Science Technology, v. 1, p. 163-87, 2010.

HEREDIA. F.J.; FRANCA-ARICA, E.M.; RIVAS-GONZALO, J.C., et al. **Chromatic chaterization of anthocyanins from red grapes**. Food Chemistry, v.63, n.4, p.491-498, 1998.

HILTON, B.W.; LIN, R.I.; TOPOR, M.G., et al. **Processed anthocyanin pigment extracts, Patente Americana 4.320.009**, 1982.

HUBERT, PH.; CECCATO, A.; CHIAP, P.; TOUSSAINT, B.; CROMMEN, J.; **STP Pharma Prat**. 1999.

IBGE. **Anuario estatístico do brasil**, Rio de Janeiro, 1975-1990, disponível em < https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/20/aeb_1975.pdf >

J. KAHOVEC; R. B. FOX; K. HATADA. **Nomenclature of regular single-strand organic polymers (IUPAC Recommendations, 2002.**

JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. **Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, p. 5207-5213, 2003.

KAHL, T., SCHRÖDER, K.-W., LAWRENCE, F. R., MARSHALL, W. J., HÖKE, H. AND JÄCKH, R. **Aniline.** In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.** Wiley, 2011

KAPADIA, G.J.; Tokuda, H. ; SRIDHAR, R.; Balasubramanian, V.; TAKAYASU, J.; BU, P.; ENJO, F.; TAKASAKI, M.; KONOSHIMA, T.; NISHINO, H.; **Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals, and cosmetic preparations.** Cancer Lett. 129, p.87-95. 1998

LEDERER, J. **Alimentação e câncer,** São Paulo: Manole Dois, 1990. 279p

LEE, X., DIAMOND, A.D. e HSU, J.T., **Equilibrium Phase Behavior of Polyethylene-glicol/Potassium Phosphate/Water Two-phase System at 4°C.** Journal of Chemical Eng. Data, v.35, p. 420-423, 1990.

LOH W. **Calorimetric Investigation of the Formation of Aqueous TwoPhase Systems in Ternary Mixtures of Water, Poly(ethylene oxide) and Electrolytes (Or Dextran).** J. Phys. Chem. B, 2000, 104, 10069-10073

LÓPEZ O.P.; JIMÉNEZ A.R.; VARGAS F.D. et al. **Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability,** Critical Reviews Food Science Nutrition, v.40, n.3, p.173-289, 2000.

LORENZI H, MATOS F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil : nativas e exótica cultivadas,** Nova Odessa, SP : Instituto Plantarum, 2002.

MAC FADDEN, J. **A produção de açaí a partir do processamento dos frutos do palmitero (Euterpe edulis Martius) na mata atlântica.** 2005. 112p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MAPARI, S. A. S. **Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants.** Current Opinial Biotechnology, v. 16, p. 231–

238, 2005

MAPARI, S. A. S.; THRANE; U.; MEYER, A. **Fungal polyketide azaphilonepigmentes as future natural food colorants**. Trends Biotechnology, v. 28, n. 6, p. 300-307, 2010.

MARMION, M. D. **Handbook of U.S. colorants**. 3 ed. Toronto: Jonh Wiley & Sons, 1991. 573p.

MEDEIROS, F. O.; **Adsorção e purificação da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através de cromatografia de troca iônica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008

MINAMI, N.M. **Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação de amiloglicosidase**. 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Comissão Nacional de Normas e Padrões Para Alimentos. **Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia . Regulamentação de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia no Brasil**; [citado 20 Out 2018]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/aditivos-alimentares>

NASCIMENTO, Alicia.; **Novo sistema de manejo conserva a palmeira-juçara**; Agência USP de notícia; Janeiro, 2015 , disponível em < <http://www.usp.br/agen/?p=200039> >; acessado em 11/2018

NASCIMENTO, M.B el al. **Estudo de Sistemas Aquosos Bifásicos Formados com PEG 1500 e Sais de Sulfato de Sódio em Diferentes Temperaturas**. Bahia: Congresso Brasileiro de Química (CBQ), 2014

Os Corantes Alimentícios. **Revista Aditivos Ingredientes**, v. 119 , p. 28-39, Junho 2015

PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. **Anthocyanins: from plant to health**. *Phytochemistry Reviews*, v. 7, p. 281-299, 2008.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V.; **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, Manole: São Paulo, 2005.

PORTO, T. S. Extração da Pró-toxina Épsilon e de uma Protease a partir de *Clostridium perfringens* em Sistemas de Duas Fases Aquosas Utilizando PEG/Citrato. 2004. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica), Faculdade de Ciências Farmacêuticas da

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

REE, E, **Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to Lutein for use in foods for particular nutritional uses**, The EFSA Journal, 315, 1, (2016)

REIS, A. **Dispersão de semenster de Euterpe edulis Martius. (Palmae) em uma floresta ombrófila densa montana da encosta atlântica em Blumenau, SC.** 1995. 154p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

REIS, M.S. dos; KAGEYAMA, P.Y. **Dispersão de sementer de Euterpe edulis Martius Palmae. Sellowia**, Itajaí, v.49/52, p.60-92, 2000.

RESOLUÇÃO - CNNPA N° 44, DE 1977. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/RESOLUCAO_CNNPA_44_1977.pdf/b8d43a0d-5c1b-4be1-ba69-67f69cf55446 , acessado em 11/2018.

ROGEZ, H. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação.** Belém: EDUFPA, 2000, 313p.

ROWE, K.S. Synthetic food coloring and behavior: A dose response effect in a double-blind, placebo-controlled, repeated-measures study. **Melbourne: v.125. p691-698. 1994.**

SALFIELD, J.R. **Practicas de Ciencia de los Alimentos**, Acribia Editorial, Espanha, 1977.

SANTOS MOREIRA, Viviane, HOJO REBOUÇAS, Tiyoiko Nair, BATISTA DE MORAES, Maria Olímpia, REBOUÇAS SÃO JOSÉ, Abel, VIANA DA SILVA, Marcondes, **Atividade Antioxidante de Urucum (bixa orellana l.) in natura e Encapsulado.** Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha [en linea] 2014, 15 (Diciembre-Sin mes) : [data de consulta: 3 de novembro de 2018] Disponível em :<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81333269011>> ISSN 1665-0204

SATIKO S.S; CHABARIBEY, D.; Maia,M.L . et al. **MARKET TRENDS FOR FOOD COLOURS IN THE FOOD INDUSTRY**, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Governo do Estado de São Paulo, São Paulo,1992, p.4-8.

SCHMIDT, A. S., VENTOM, A. M., ASENJO, J. A. **Partitioning and purification of a-amylase in aqueous two-phase systems, Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, n. 15, p. 131-142, 1994.

SCHOLZ, F.; KOMORSKY-LOVRIC, S; LOVRIC, M. **Liquid interfaces and a new method to study electrochemical processes at well-defined three-phase junctions.** Electrochemistry Communications.

SCHULTZ, J. **Compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante de açaís de Euterpe edulis Martius e Euterpe oleracea Martius submetidos a tratamentos para sua conservação.** 2008. 50p. Monografia (Trabalho de conclusão de curso – Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SEADER, J. D.; HENLEY, E. J.; ROPER, D. K. **Separation Process Principles: Chemical and Biochemical Operations.** 3ª ed. Hoboken: JohnWiley & Sons, Inc., 2011.

SILVA, A.P.R. **Purificação de β -galactosidase de *kluyveromyces marxianus* Utilizando Sistema Aquoso Bifásico e Separação por Membranas.** Monografia (Programa de Pós graduação em engenharia e ciência de alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

SILVA, L. H. M.; LOH W. **Calorimetric Investigation of the Formation of Aqueous TwoPhase Systems in Ternary Mixtures of Water, Poly(ethylene oxide) and Electrolytes (Or Dextran).** J. Phys. Chem. B, 2000, 104, 10069-10073

STRINGHETA, P.C. **Uso e aplicação de corantes naturais. Apresentação realizada no evento sobre “Corantes artificiais e naturais em alimentos”.** ITAL, Campinas, 2007

SZTAJN, M. **Avaliação da ingestão potencial de corantes artificiais por crianças em idade escolar.** Campinas, SP: UNICAMP, 1988. p. 169.

TJERNELD, F.; PERSSON, I.; ALBERTSSON, P.; HAHN-HAGERDAL, B. **Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. 1. partition 116 of cellulases from Trichoderma reesei.** Biotechnology and Bioengineering, v. 27, p.1036-1043, 1985.

D. D. WILLIAMSON. **THE BASICS of Caramel Colours.** Louisville: 1999.

TOLEDO, M. C. F., GUERCIHON, M. S. **Corantes artificiais em alimentos.** v.10, LOCAL, :Ciências Tecnologia Alimentar (SBCTA), 1990. p.109-111.

TREYBALL, R. E. Mass-transfer operations. New York: McGraw-Hill Book Company 1980.

VIA FARMA, **Polietilenoglicol 4000, Laxante osmótico livre de eletrólitos, Agente cosmético e alimentício.** 2013, disponível em < <http://www.viafarmanet.com.br/wp->

content/uploads/2015/07/PEG-4000.pdf>

WARD, N. I. **Assessment of chemical factors in relation to child hyperactivity.** Journal of Nutritional & Environmental Medicine, v.7, n.4, p.333-42, 1997.

WEITZ, J. H. **Plantas da amazônia e seu aproveitamento tecnológico.** CONGRESSO BRASILEIRO DE CORANTES NATURAIS; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE URUCUM, 1994, Belém: EMBRAPACPATU, 1994. p. 2-9.

WROLSTAD RE. **Colors and pigment analysis in fruit products.** Coravallis, Oregon Agricultural Experimental Station, 1976.

WU, X.; LIANG, L.; ZOU, Y.; ZHAO, T.; ZHAO, J.; LI, F.; YANG, L. **Aqueous twophase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.).** Food Chemistry, v. 129, p. 443–453, 2011.

YAMAZAKI, H. ET al. **Effect of food additives on rabbit platelet function.** II. Jpn. J. Toxicol. Environ. Health; v.40, n.1, p.41, 1994.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: Physical chemistry and bioanalytical application.** New York: Marcel Dekker INC., 1995.

